

Rapport d'activités mars 1990-mars 1991
conservation, multiplication et
caractérisation du Germplasm amazonien
d'hévéa



Institut de Recherches sur le Caoutchouc

*Département du Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)
42, rue Scheffer 75116 Paris (France) - Tél. : (1) 47.04.32.15*

Télex : 620871 INFRANCA PARIS

**Rapport d'activités mars 1990-mars 1991
conservation, multiplication et caractérisation du
Germplasm amazonien d'hévéa**

DN/MM
Mars 199

SOMMAIRE

	Pages :
AVANT-PROPOS	1
1. RAPPEL	2
2. CARACTERISATION DU GERMPLASM	3
2.1. Estimation des valeurs d'aptitude à la combinaison du matériel Amazonien	3
2.2. Etude des corrélations valeur propre /valeur en croisement	6
2.3. Estimation de la valeur propre agronomique valeur propre /valeur en croisement	8
3. CAMPAGNE DE POLLINISATION ARTIFICIELLE	13
3.1. Campagne 1990	13
3.2. Valeur agronomiques des descendance légitimes de la campagne de pollinisation de 1988	18
3.3. Sélection de la série IRCA 1300 (82 clones numérotés de IRCA 1300 à 1381) dans le CES 1988	19
3.4. Jardin de pollinisation artificielle (BM.OA.40)	20

	Pages :
4. ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX MALADIES DE FEUILLES DU MATERIEL AMAZONIEN	21
5. POLLINISATION LIBRE	26
6. DIVERSITE GENETIQUE	28
6.1. Isozymes	28
6.2. RFLP - ADN nucléaire	28
6.2.1. Etat des techniques	29
6.2.2. Application à l'étude de la diversité	33
6.3. RFLP - ADN mitochondrial	
6.3.1. Matériel et méthodes	34
6.3.2. Résultats	40

AVANT-PROPOS

Ce rapport a pour objet de faire état des activités sur :

"L'évaluation, la caractérisation et l'exploitation de nouvelles ressources génétiques obtenues par prospection en forêt amazonienne pour l'Amélioration de l' Hevea",

pour lesquelles l'IRCA bénéficie d'une participation financière de la Commission des Communautés Européennes dans le cadre du programme "Sciences et Techniques au Service du Développement".

Trois Centres de Recherches sont concernés par ce programme :

la station de l' IRCA/M.R.S., en Côte d'Ivoire,

le laboratoire de l' IRCA/CIRAD, à Montpellier, en France,

le laboratoire de LOUVAIN LA NEUVE, en Belgique.

Il s'agit du troisième rapport, dans lequel sont réunis les activités et les résultats à ce jour des différents Centres, pour la période :
Année 1990.

1. **RAPPEL**

A l'issue de plusieurs prospections réalisées en Amazonie, une collection de base a été établie en Côte d'Ivoire ; elle comprend :

- 41 clones issus d'arbres "PLUS" de la forêt prospectés en 1974,
- 131 clones de même origine prospectés en 1981,
- 2423 génotypes issus de graines récoltées lors de cette même prospection IRRDB,
- 342 génotypes issus de collections établies vers les années 1950 en Colombie par le botaniste E. SCHULTES,
- environ 100 génotypes d'origines diverses (Pérou, Etat de l'Amazonas au Brésil).

Cette collection a été enrichie en 1990 par l'introduction de 187 génotypes amazoniens de la prospection IRRDB de 1981, en provenance du Centre Asiatique de Conservation du Germplasm, situé en Malaisie, et sélectionnés par les généticiens du RRIM (Rubber Research Institute of Malaysia). Ce transfert témoigne du courant d'échanges d'informations et de matériel végétal avec le Continent Asiatique.

C'est donc un total de 3340 origines qui constitue maintenant la base génétique du Germplasm *Hevea*. C'est cette population qu'il convient d'étudier et de caractériser pour constituer, après sélection, une population de travail apte, par la valeur propre et la valeur en croisement des individus qui la composent, à faire progresser l' Amélioration génétique de cette espèce. Cette démarche peut constituer un modèle applicable à d'autres espèces, en particulier des plantes pérennes provenant de prospection.

2. CARACTERISATION DU GERMPLASM

Les précédents rapports ont largement montré la faible valeur agronomique des individus directement issus de la forêt amazonienne. Une conclusion s'impose : il est illusoire de trouver directement dans la population prospectée des individus exceptionnels pouvant être multipliés végétativement pour donner des clones utilisables en plantation. Il convient alors de raisonner l'utilisation en terme d' **Amélioration génétique**, en faisant succéder des opérations de croisements et de sélection qui aboutissent à la **création de matériel végétal performant**.

L'étape préliminaire à ce schéma constitue la sélection d'une population de parents potentiels. En effet, il est illusoire, sinon impossible, d'utiliser les quelque 3000 génotypes en collection à des fins de croisements. D'autre part, les observations effectuées toutes ces dernières années montrent que l'ensemble de ces génotypes présente une grande variabilité en tant que géniteurs et qu'il convient d'en faire un tri préalable.

Les trois chapitres suivants font état de résultats nouveaux qui permettront de préciser la stratégie à adopter.

2.1. Estimation des valeurs d'aptitude à la combinaison du matériel amazonien.

Une première estimation des paramètres génétiques a été faite dans les champs d'évaluation de seedlings qui, rappelons-le, sont les expériences accueillant les individus issus de pollinisations artificielles qui, après la sélection de ceux agronomiquement intéressants pour l'entrée dans le schéma de sorties clonales, sont maintenus et entretenus sous forme de collections vivantes. Ces parcelles expérimentales, parce qu'elles portent sur des individus entiers depuis le système racinaire jusqu'à l'appareil aérien, présentent des avantages sur un autre type d'essai d'études génétiques où cette fois les génotypes sont greffés, pour l'estimation de la valeur des familles d'individus de plein-frères et de demi-frères qui les composent.

De plus, l'évaluation y étant rapide (2 ans), elle permet de palier, malgré la forte densité de plantation de ces champs (4000 arbres par hectare), l'installation de trop fortes compétitions entre arbres voisins (ce qui aurait pour conséquence d'augmenter les interactions génotype/milieu).

Il faut cependant garder à l'esprit que

1. l'hypothèse d'absence de compétition entre arbres n'est probablement vraie qu'en partie, un encombrement pouvant bien avoir lieu à 2 ans au niveau racinaire, induisant ainsi une compétition trophique entre individus,
2. les méthodes d'estimation des aptitudes à la combinaison par les covariances entre apparentés sont relativement biaisées pour les deux raisons suivantes :
 - les décalages des périodes de floraison observés entre certains clones rendent pratiquement (voire, totalement) impossible la réalisation de croisements entre eux, empêchant ainsi d'avoir dans la descendance de ces géniteurs, tous les types d'apparentement nécessaires à l'estimation des composantes de la variance génétique,
 - les tailles des familles, dues aux faibles taux de réussite de la pollinisation artificielle chez l'hévéa, sont réduites et assez variables d'une descendance à l'autre.

Malgré ces restrictions, les données des champs d'évaluation de 1987 et 1988 ont servi au calcul de valeurs en croisements de quelques génotypes dont une majorité de clones amazoniens. La méthode utilisée s'appuie sur les comparaisons d'aptitude à la combinaison observée à travers les familles de plein-frères issues d'un géniteur testeur commun.

Les caractères mesurés sont la vigueur par l'accroissement de circonférence entre la première et la deuxième année après la mise en place de l'essai, et la capacité de production. Celle-ci se mesure par micro-coupures sur une durée de quatre semaines dont deux sans stimulation (P1 et P2), et deux après stimulation (PS1 et PS2). Les arbres sont "saignés" du lundi au vendredi et la production est cumulée à la fin de la semaine.

Il convient de remarquer dans ces résultats, la grande diversité de comportement des individus issus du germplasm amazonien, utilisés comme parents lorsqu'on les croise avec un clone testeur (en l'occurrence PB 260). Certains d'entre eux ont un effet similaire négatif ou positif sur la croissance et la production, d'autres vont avoir des effets opposés plus de la moitié vont avoir un effet similaire pour les 4 paramètres de production mesurés (avec ou sans stimulation), les autres vont présenter des caractéristiques beaucoup moins stables.

Il apparaît donc que vouloir apprécier la valeur en croisements de l'ensemble des individus constituant la population Germplasm d'origine amazonienne, en plus du travail considérable que cela représenterait, aboutirait à la constitution d'un fichier de résultats très difficile à exploiter, aucune tendance ou aucun regroupement ne se profilant au travers de cette étude préliminaire.

Ceci n'enlève rien à l'intérêt de pratiquer des croisements de type **W x Am** destinés à apprécier la valeur agronomique, mais amène à considérer une stratégie permettant d'opérer un tri rationnel des parents potentiels pour n'en retenir que les plus intéressants : il s'agit en l'occurrence d'apprécier les corrélations "**valeur propre/valeur en croisement**" de ces individus issus de prospection, le tri préalable pouvant éventuellement se faire sur la valeur agronomique observée (valeur propre) des individus destinés aux croisements.

Tableau No. 1

Crossing values of various Amazonian genotypes assessed
in seedling trials (PB 260 female)

Genotypes	ACR	P1	P2	PS1	PS2
MT/I/37 A	- 1.50	- 3	- 8	- 63	- 73
AC/B/08/122	- 5.21	- 26	- 13	- 46	- 29
AC/B/17/12	1.80	- 9	- 20	119	11
AC/S/12/102	10.87	- 8	- 25	- 129	- 56
FDR 76	- 2.17	31	28	213	140
FDR 91	- 1.86	10	1	12	52
GU 1479	- 1.85	9	20	130	80
MT/C/01/04	- 4.38	- 12	9	12	- 36
MT/C/01/09	- 2.30	- 27	- 28	- 200	96
MT/C/04/01	- 2.19	- 22	- 26	- 205	- 84
MT/C/04/02	1.52	9	16	- 8	- 5
MT/IT/13/11	1.93	16	6	17	69
MT/IT/18/22	16.42	- 13	- 20	31	- 43
RO/CM/10/36	- 1.82	7	10	- 11	- 95
RO/I/110	- 2.03	- 2	5	55	65
RO/I/81	- 5.05	- 12	- 11	- 58	- 25
RO/JP/03/04	9.68	- 21	- 22	- 94	- 60
AC/F/05/39	-	8	7	- 53	- 2
AC/S/11/41	-	- 34	- 29	- 66	- 18
AC/T/02/02	-	- 5	10	- 57	26
MT/C/01/21	-	5	12	73	14
MT/C/01	-	- 15	- 18	- 108	- 57
MT/C/03/03	-	- 15	- 25	- 54	- 23
MT/C/04/02	-	- 5	1	59	10
RO/A/07/31	-	- 35	- 10	- 161	- 80
RO/A/07/07	-	-	- 5	93	- 21
RO/PB/01/02	-	9	16	61	64
RO/PB/02/01	-	47	48	215	109
RO/I/105	7.51	- 2	- 1	28	- 31
RO/PB/02/10	-	40	22	44	- 37
AC/6/12/78	8.58	21	18	27	39
RO/I/11	- 1.58	19	11	113	5

2.2. Etude des corrélations valeur propre / valeur en croisement.

Un champ de clones à petite échelle a été installé en 1985, afin de comparer la variabilité intra et inter-familles à l'intérieur de descendance de type **Wickham x Amazonien**.

Elle compare 16 familles **W x Am** réalisées par les croisements de 2 clones **W** et 8 clones **Am** ainsi que les clones parentaux plantés comme témoins.

Les calculs de corrélation entre les performances agronomiques des parents et des descendance ont donc pu être calculés. Les résultats montrent qu'au niveau de la croissance les corrélations sont très faibles : il n'y aurait pas de lien entre parent/descendance. Au niveau de la production par contre, les coefficients de corrélation sont beaucoup plus élevés, et toujours positifs quel que soit le paramètre mesuré les liens entre la valeur propre des parents et leur valeur en croisement sont ici vérifiés.

Les corrélations inverses entre la vigueur des descendance et la productivité des parents sont plus délicates à interpréter.

En conclusion, ces résultats (qui demandent à être confirmés par une expérimentation plus complète) incitent à accentuer l'effort sur l'appréciation de la productivité des génotypes potentiellement utilisables comme géniteurs pour effectuer un tri parmi ceux-ci et ne retenir que ceux qui ont la meilleure chance de donner de bonnes descendance.

Qu'en est-il de cette évaluation de la valeur propre "**production**" dans notre dispositif expérimental actuel ?

Table 2 : Correlations between the agronomic performances of parents and those of their progenies.

Parents	Progenies			
AMAZONIAN	PI	PS	PII	ACR
PI	0.673	0.606 NS	0.575 NS	- 0.656 NS
PS	0.717	0.738	0.665 NS	- 0.550 NS
PII	0.661 NS	0.602 NS	0.586 NS	- 0.677 NS
ACR	0.106 NS	- 0.054 NS	-0.038 NS	- 0.638 NS

NS : Non-significant test

*** : Test significant at 5 % and 1 % respectively

df (degree of freedom) = 6

PI : Cumulated production before stimulation

PS : Production during stimulation

PII : Cumulated production after stimulation

ACR : Girth increase between 3 and 4 years.

2.3. Estimation de la valeur propre agronomique.

De 1985 à 1986, un essai (BM.OA.33) comprenant 6 arbres par génotype, a permis de réaliser une évaluation agronomique précoce assez précise de 64 génotypes amazoniens également présents dans l'évaluation en champ de la totalité de la prospection (BM.OA.38).

Dans les deux essais, les arbres sont des greffés. Le recépage a eu lieu respectivement en Juin et en Décembre 1985.

Les résultats issus de BM.OA.33 sont statistiquement beaucoup plus précis puisque obtenus sur 6 arbres par génotype, alors que chacun d'entre eux n'est représenté que par un seul arbre dans BM.OA.38.

Les moyennes des résultats obtenus dans les 2 expériences sont comparables. Les corrélations entre les 2 essais pour la croissance, le branchement et la production ont donné les résultats suivants :

- *Pour la croissance*, on trouve une bonne corrélation

$$(r = 0,68^{**} \text{ avec un ddl} = 62),$$

et on peut considérer que la croissance mesurée sur un seul arbre par génotype donne une bonne estimation de celui-ci pour ce caractère.

- *Pour le branchement*, la relation est aussi assez bonne

$$(r = 0,50^{**} - \text{ddl} = 62)$$

- *Pour la production* par contre, considérer 1 arbre par génotype n'est pas suffisant pour apprécier sa valeur.

La corrélation entre les valeurs issues des 2 expériences est très faible et non significative :

$$(r = 0,38 \quad \text{ddl} = 62).$$

Table 3. Agronomic values of 64 genotypes both in BM.OA.33 and BM.OA.38 (POP: the genotype belongs to AMPLUS89).

	BM.OA.33:1989				BM.OA.38:1989		
GENOTYPE	GIRTH MAY89 (mm)	BRANCHING REP A	G/T/T REP B CP8-13 (24 taps)	GIRTH JUN89 (mm)	BRANCH.G/T/T (48 taps)		
PB235c	485	5	5	44.6			
PB235a	524	5	5	43.1			
PB235b	511	5	5	39.1			
GT1b	373	3	3	10.8	379	3.8	11.8
GT1a	345	2	3	10.0			
GT1c	383	3	3	9.4			
ACS / 8 / 5 POP	320	2	2	1.7	310	3	1.23
ROJP / 3 / 13	370	3	4	1.6	300	4	0.34
ROC / 9 / 33	446	2	3	1.3	508	3	0.80
MTC / 2 / 42	304	3	2	1.2	278	3	0.81
MTIT / 15 / 16	371	2	3	1.2	325	2	0.00
ROC / 9 / 57	414	4	4	1.1	418	3	0.36
ROOP / 4 / 23	319	2	2	1.0	298	2	0.46
MTC / 1 / 4	344	3	3	1.0	344	3	0.07
ROC / 8 / 36	284	1	1	1.0	307	2	0.10
MTA / 21 / 10 POP	323	2	3	1.0	294	2	1.56
ROOP / 4 / 19 POP	319	1	1	1.0	476	5	8.63
ACS / 11 / 28	342	2	3	0.9	298	3	0.00
MTC / 4 / 29	319	2	2	0.9	330	3	0.59
RO I 30 POP	345	3	2	0.9	392	3	6.86
ACB / 17 / 12	343	3	3	0.8	330	2	1.12
ACB / 19 / 02	293	1	2	0.7	271	2	0.00
ACB / 19 / 22	298	1	1	0.7	342	3	0.08
ACF / 5 / 10	411	3	2	0.7	277	1	
ROA / 7 / 99 POP	498	5	5	0.6	464	5	0.57
ACS / 8 / 111	416	2	2	0.6	464	3	0.68
ACB / 15 / 37	337	2	2	0.6	342	3	0.00
ROPB / 2 / 25	313	3	3	0.6	314	3	0.00
ROA / 7 / 66	353	3	1	0.5	361	1	0.08
ACS / 10 / 2	293	1	1	0.5	290	1	0.09
ROJP / 3 / 5	350	4	3	0.5	300	3	0.40
RO I 11	281	4	2	0.4	175	1	
ACS / 11 / 30	352	2	3	0.4	342	3	0.13
ACB / 19 / 4 POP	388	3	3	0.4	437	3	2.90
ACF / 7 / 8	301	1	3	0.4	308	3	1.54
ROPB / 2 / 1	314	3	3	0.4	285	2	0.50
ACT / 4 / 15	313	3	3	0.4			
ACB / 19 / 68 POP	327	1	3	0.4	312	3	12.03
ACF / 5 / 76	331	1	1	0.4	341	2	0.20
MTIT / 15 / 28	326	2	3	0.3	290	3	0.00
MTIT / 18 / 2	293	2	2	0.3	261	2	0.73
ACX / 20 / 7	294	1	1	0.3	300	1	0.00
ROCM / 10 / 2	325	3	2	0.3	410	3	0.00
MTIT / 16 / 29	262	2	2	0.3	252	1	0.20
RO I 66 POP	297	3	3	0.3	344	4	0.92
ROJP / 3 / 57 POP	360	3	4	0.3	413	5	0.66
ROCM / 10 / 34	341	3	3	0.3	330	2	0.06
ROCM / 10 / 112	429	4	3	0.2	437	3	0.05
MTIT / 18 / 3	261	3	3	0.2	218	3	
MTC / 5 / 4	302	3	3	0.2	335	3	0.19
ACF / 5 / 36	336	1	1	0.2	242	1	
ACT / 1 / 24	343	1	1	0.2	355	2	0.00
ACS / 10 / 18	301	1	1	0.2	340	2	0.07
ROJP / 3 / 17	307	3	2	0.2	330	3	0.21
MTIT / 17 / 9	280	3	2	0.1	291	3	
ROPB / 2 / 11	297	4	2	0.1	306	2	0.18
MTIT / 13 / 7	274	2	3	0.1	320	3	0.00
ROJ / 5 / 14	324	2	4	0.1	316	3	0.00
ROA / 7 / 9	303	2	1	0.1	127	1	
ROPB / 2 / 13	281	3	2	0.1	316	3	0.88
RO I 20	224	2	1	0.1	295	2	0.04
ACF / 6A / 28	298	1	3	0.1	248	2	
ACS / 12 / 56	322	1	1	0.1	335	2	0.00
ROJP / 3 / 14	265	1	1	0.0	265	2	0.06
ACF / 5 / 35	375	2	1	0.0	311	1	0.00
MTVBA / 25 / 3	306	1	1	0.0	270	2	0.00
ACB / 19 / 14	323	2	3	0.0	315	3	0.00
ROPB / 2 / 8	328	3	2	0.0	355	3	0.16
MTIT / 15 / 3	291	2	2	0.0	280	3	0.00
MTIT / 13 / 11	322	2	1	0.0	298	2	0.00
AVERAGE: (AMAZONIAN ONLY)	327	2.3	2.3	0.48	323	2.5	0.83

Ces résultats sont importants à prendre en considération :

La production mesurée sur un génotype représenté par un arbre dans l'expérience BM.OA.38 ne peut être considérée comme très fiable.

Cependant, si on regroupe les 64 génotypes en 7 classes de production, on retrouve une corrélation de rangs positive et significative entre les 2 essais (tableau 4), ce qui montre qu'une présélection opérée dans BM.OA.38 est justifiée : les génotypes ne donnent pratiquement pas de production pouvant d'ores et déjà éliminés.

Table 4 : Relation, for yield, between the trials BM.OA.33 and BM.OA.38 (4 years old).

Class	Number of genotypes	G/T/T in BM.OA.38	G/T/T in BM.OA.33
1	8	4,48	0,82
2	8	0,76	0,62
3	8	0,38	0,71
4	8	0,14	0,39
5	7	0,06	0,36
6	17	0,00	0,32
7	7	not tapped	0,26

Après avoir consulté un expert en génétique quantitative et des populations de l' INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE à ORLEANS, la stratégie de l' IRCA en ce qui concerne l'utilisation du Germplasm a été modifiée :

Après avoir montré que la valeur en croisement du matériel végétal amazonien était très variable et que, au moins pour la production, cette valeur en croisement était liée à la valeur propre de chacun des génotypes, il convient d'améliorer sensiblement l'estimation de cette valeur propre pour rendre plus efficace la sélection d'une population parentale.

Aussi a-t-il été proposé de surseoir à l'installation de 2 jardins isolés de pollinisation libre, qui devraient réunir les meilleurs géniteurs pour initier un système de sélection récurrente, en attente de meilleures informations pour choisir d'une façon plus pertinente les génotypes entrant dans leur composition.

Il a été décidé de maintenir la réalisation de jardins de pollinisation libre de type méthodologique, constitués de clones dont on pourra suivre les descendance grâce aux marqueurs définis par l'électrophorèse, afin d'apporter des précisions indispensables sur la biologie de la reproduction de l'hévéa en pollinisation libre.

L'année 1991 sera consacrée à l'observation des dates de floraison des clones qui constitueront ces jardins grainiers et qui, obligatoirement, doivent être synchrones, à la localisation des emplacements expérimentaux en isolation complète avec d'autres hévéas et à l'établissement définitif des protocoles.

Enfin, il a été décidé d'élargir à environ 400 génotypes la population de travail renommée "AM PLUS 90" la population Am PLUS 89 composée de 206 génotypes, pour tenir compte du manque de précision de l'expérience BM.OA.38, et de faire une évaluation plus précise de ces 400 génotypes dans un champ de clones, selon les modalités suivantes :

Mise en place d'un essai d'évaluation agronomique numéroté BM.OA.50 sur une parcelle d'une surface de 6,50 hectares, préparée et semée de graines en champ en 1989.

Greffage à partir de Novembre 1990, de 362 génotypes de AM 82 PLUS à raison de 2 parcelles élémentaires de 3 arbres par génotype, dans un dispositif divisé en 17 sous-expériences comprenant toutes les témoins GT 1, PFB 5 et MT/1/4 (clones testés dans BM/OA.33 et 38).

L'essai comporte au total 986 parcelles (le protocole figure en annexe du document).

Un deuxième tour de greffage interviendra en Avril-Mai 1991 ; le recépage aura lieu en Juin 1991.

Pour des raisons de disponibilité en bois de greffe, 46 génotypes n'ont pu être greffés dans cet essai BM.OA.50 et devront donc être introduits dans d'autres essais dès que possible.

3. CAMPAGNE DE POLLINISATION ARTIFICIELLE.

3.1. Campagne 1990.

Les objectifs de la campagne 1990 étaient les suivants :

- Compléter, et si possible achever, la réalisation de plans de croisements factoriels déjà initiés en 1988 et 1989, qui comporteraient 2 clones femelles **Wickham** (PB 260 et AVROS 2037) et 20 clones mâles **Amazoniens** représentant les 2 groupes génétiques identifiés par électrophorèse ;

- réaliser des croisements entre clones **Wickham** et hybrides de première génération **Wickham x Amazonien** dans des systèmes de rétro-croisements permettant de réaliser un tableau croisé à double entrée de 5 femelles **Wickham** confrontées à 9 mâles **Wickham x Amazonien**.

Les résultats obtenus cette année pour les croisements **W x Am** figurent dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Croisements **Wickham x Amazonien** effectués en 1990.

Femelles	Mâles	Nbre Pollini- sations	%	Nombre de graines			Nbre plants en CES	% Réus- site pollin.
				Récolt.	Semées	Germées		
AV.2037	AC/F/05/39*	1184	1,27	30	30	30	30	0,84
	AC/S/08/122	1241	0,56	12	12	10	10	0,27
	AC/T/02/02	982	0,51	12	12	12	12	0,41
	MT/C/01/X	895	0,11	3	3	3	3	0,11
	MT/C/01/09	400	0,75	-	-	-	-	-
	RO/C/09/04	1003	0,30	9	9	9	9	0,30
	RO/CM/10/02*	1067	0,56	18	18	15	13	0,41
	RO/J/05/11	1203	0,58	10	10	7	7	0,19
	RO/OP/04/21*	1351	1,11	47	47	42	40	0,99
	RO/PB/01/02	823	1,58	22	21	21	21	0,85
	RO/PB/02/19*	655	2,90	30	30	29	29	1,48
	RO/PB/02/54	967	0,21	3	3	3	3	0,10
	TOTAL	11771	0,32	196	195	181	177	0,50
PB 260	RO/A/07/99*	970	3,81	72	72	69	67	2,30
TOTAL GENERAL		12741	1,04	268	267	250	244	0,64

Il apparaît que, à part le clone MT/C/01/09 qui n'a donné aucune descendance, tous les croisements effectués ont abouti à la constitution d'une famille hybride, mais de très faible effectif puisque seulement 4 ont atteint l'effectif minimal de 24 individus.

Assez peu satisfaisants dans l'ensemble, ces résultats sont le fait d'un faible taux de nouaisons, aussi bien sur AVROS 2037 que sur PB 260. Le comportement de la première femelle n'est pas une surprise, mais le cas de PB 260, avec seulement 3,81 % de nouaisons, est révélateur d'une mauvaise réussite générale cette année. De plus, ces faibles résultats constatés par ailleurs sur des croisements de type **Wickham x Wickham** non mentionnés, se sont accompagnés de problèmes de germination de graines et de mortalités post-germination.

Comme aucune modification dans les techniques d'obtention d'hybrides n'a été apportée lors de cette campagne et que le niveau de surveillance des opérations a été identique par rapport aux autres années, il est vraisemblable que les facteurs climatiques sont en cause, sans que l'on soit en mesure d'en déterminer l'importance.

Le tableau No. 6 donnant la liste des génotypes issus de croisements **W x A** depuis le début des opérations, montre que la faiblesse de cette campagne de 1990 ne nuit pas l'approche de l'estimation de la valeur de ce matériel nouveau, 3655 hybrides ayant été déjà créés.

TABLE 6.: List of the A81 genotypes used (as male) in W*A crosses, and size of the progenies.
POP means that the genitor belongs to AMPLUS89.

		RANGING ACCORDING TO THE SIZE	
MALE GENITOR	NUMBER	MALE GENITOR	NUMBER
AC/B/17/12	47	RO/I/50	148
AC/B/18/6	55	RO/I/110	136
AC/B/19/72	8 POP	MT/I/37A	122
AC/F/5/39	26	MT/C/4/2	119
AC/I/10	8	RO/I/98	108
AC/I/2	14	RO/A/7/99	99 POP
AC/I/4/34	26	MT/I/38A	97
AC/I/9	17	RO/CM/10/22	94
AC/S/11/41	72	RO/I/70	82
AC/S/11/75	11	MT/I/45A	76
AC/S/12/102	36	RO/CM/10/28	72
AC/S/12/18	11	AC/S/11/41	72
AC/S/12/26	26	MT/C/1/4	69
AC/S/12/78	44	MT/C/1/9	68
AC/S/12/86	28 POP	MT/C/1/21	66 POP
AC/S/13/2	23	RO/CM/10/101	66
AC/S/8/122	19	RO/PB/2/1	65
AC/S/8/5	14 POP	MT/C/1/X	63
AC/T/2/2	37	MT/C/3/3	63
AC/T/4/16	23	RO/CM/10/74	62
MT/C/1/19	4	RO/A/7/31	62
MT/C/1/21	66 POP	RO/I/85	60
MT/C/1/4	69	RO/JP/3/2	60
MT/C/1/9	68	RO/I/109	57
MT/C/1/X	63	AC/B/18/6	55
MT/C/3/3	63	MT/C/4/1	52
MT/C/4/1	52	RO/OP/4/13	51
MT/C/4/2	119	MT/IT/13/11	49
MT/C/4/X	11	AC/B/17/12	47
MT/IT/13/11	49	RO/J/5/11	44
MT/IT/18/22	15	RO/I/94	44
MT/I/31	29	RO/PB/2/10	44
MT/I/37A	122	RO/JP/3/4	44
MT/I/38A	97	RO/PB/1/2	44
MT/I/45A	76	RO/CM/10/36	44
RO/A/7/30	18	AC/S/12/78	44
RO/A/7/31	62	RO/I/11	43
RO/A/7/7	21	RO/PB/2/2	42
RO/A/7/86	3	RO/JP/3/1	41
RO/A/7/99	99 POP	RO/I/105	40 POP
RO/CM/10/101	66	AC/T/2/2	37
RO/CM/10/112	28	AC/S/12/102	36
RO/CM/10/2	17	RO/CM/10/90	34
RO/CM/10/22	94	RO/PB/2/X	33

RO/CM/10/23	9		RO/PB/2/5	33
RO/CM/10/28	72		RO/CM/10/93	32
RO/CM/10/3	27		RO/OP/4/21	29
RO/CM/10/36	44		MT/I/31	29
RO/CM/10/58	9		RO/CM/10/112	28
RO/CM/10/67	3		AC/S/12/86	28 POP
RO/CM/10/74	62		RO/CM/12/2	27
RO/CM/10/85	25		RO/CM/10/3	27
RO/CM/10/90	34		AC/I/4/34	26
RO/CM/10/93	32		AC/S/12/26	26
RO/CM/10/97	17		AC/F/5/39	26
RO/CM/11/42	13		RO/CM/10/85	25
RO/CM/12/2	27		RO/JP/3/11	24 POP
RO/C/8/37	11		AC/S/13/2	23
RO/I/105	40	POP	AC/T/4/16	23
RO/I/109	57		RO/A/7/7	21
RO/I/11	43		RO/PB/2/19	21
RO/I/110	136		RO/I/47	20
RO/I/2	3		RO/I/72	20
RO/I/47	20		AC/S/8/122	19
RO/I/48	5	POP	RO/A/7/30	18
RO/I/50	148		RO/CM/10/2	17
RO/I/70	82		AC/I/9	17
RO/I/71	4		RO/CM/10/97	17
RO/I/72	20		RO/J/6/15	17
RO/I/81	15		RO/JP/3/41	15
RO/I/85	60		RO/I/81	15
RO/I/94	44		MT/IT/18/22	15
RO/I/98	108		RO/PB/2/54	15
RO/JP/3/1	41		AC/S/8/5	14 POP
RO/JP/3/11	24	POP	AC/I/2	14
RO/JP/3/2	60		RO/CM/11/42	13
RO/JP/3/4	44		RO/C/8/37	11
RO/JP/3/41	15		MT/C/4/X	11
RO/J/5/11	44		AC/S/12/18	11
RO/J/6/15	17		AC/S/11/75	11
RO/OP/4/13	51		RO/CM/10/58	9
RO/OP/4/21	29		RO/CM/10/23	9
RO/OP/4/4	7		AC/B/19/72	8 POP
RO/PB/1/2	44		AC/I/10	8
RO/PB/2/1	65		RO/OP/4/4	7
RO/PB/2/10	44		RO/I/48	5 POP
RO/PB/2/19	21		RO/I/71	4
RO/PB/2/2	42		MT/C/1/19	4
RO/PB/2/5	33		RO/A/7/86	3
RO/PB/2/54	15		RO/I/2	3
RO/PB/2/X	33		RO/CM/10/67	3
TOTAL NUMBER:		3655		

Il apparaît cependant que réaliser les plans de croisements envisagés représente une sérieuse difficulté puisqu'après 3 années d'effort, les objectifs n'ont pas été atteints.

Quatre familles en rétro-croisement de type **Wickham x (Wickham x Amazoniens)** ont été créées lors de cette campagne de pollinisation dont 2 d'entre elles ont atteint l'effectif minimum de 24 individus (l'une présente 22 individus) (Cf. tableau No. 7).

La difficulté principale se situe au niveau du choix des géniteurs **Wickham** femelles ; en effet, la plupart d'entre eux ont comme parent, soit le clone PB 5/51, soit un clone très fortement apparenté, tous présentant de très bonnes caractéristiques de fécondité. Reprendre ces clones dans les rétro-croisements impliquerait une certaine consanguinité qui nuirait à une bonne appréciation des valeurs génétiques. On se voit donc contraint d'utiliser des clones **Wickham**, parents femelles de faible fécondité.

Il s'agit cependant d'une opération portant sur plusieurs campagnes de pollinisation. Les individus issus de ces croisements sont mis en observation, puis en collection "à perpétuité", ce qui permet de les reprendre ensemble pour des expériences agronomiques globales.

*En 1991, toutes les pollinisations artificielles viseront à des croisements opérés avec le matériel **Amazonien**, les croisements de type **W x W** étant reportés sine die.*

Une réflexion de fond sera menée avec les spécialistes en génétique quantitative, pour orienter au mieux la stratégie d'établissement de plans de croisements opérationnels.

Tableau 7 : Croisements Wickham x (Wickham x amazonien) effectués en 1990

Femelles	Mâles	Nbre Pollini- sations	% nouai- sons	Nombre de graines			Nbre plants en CES	% Réus- site pollin.
				Récolt.	Semées	Germées		
AV.2037	IRCA 515	566	1,41	24	24	22	22	1,30
	IRCA 519	995	0,40	9	9	9	9	0,30
	IRCA 632	1072	1,12	33	33	30	30	0,93
	TOTAL	2633	0,91	66	66	61	61	0,77
PB 260	IRCA 623	818	2,57	65	65	58	50	2,04
TOTAL GENERAL		3451	1,30	131	131	119	111	1,07

3.2. Valeurs agronomiques des descendance légitimes de la campagne de pollinisation de 1988.

En 1990, le CES 1988 a été analysé à 2 ans. Il comportait 2346 génotypes légitimes dont 1665 issus de croisements **W x W**, 567 issus de croisements **W x A** et 114 issus de croisements **W x WA** ; tableau 8 :

Croisement	Famille	Circonf. à 2 ans (mm)	Production (mg)
W x W	PB 217 x RRIM 703 (meilleure famille)	129	5644
W x W	PB 260 x PR 261 (moins bonne famille W x W)	120	1643
W x WA	PB 260 x IRCA 515 PB 260 x IRCA 519 GT 1 x IRCA 519	119 124 130	4157 2233 1773
W x A	PB 260 x RO/PB/2/1 PB 260 x RO/PB/1/2 PB 260 x AC/S/11/41 PB 260 x MT/C/4/2 PB 260 x AC/T/2/2 PB 260 x MT/C/1/21 PB 260 x RO/PB/2/10 PB 260 x AC/F/5/39 PB 260 x MT/C/3/3 PB 260 x MT/C/1/X PB 260 x RO/A/7/31	123 122 115 114 133 108 126 136 121 114 127	1974 1809 1545 1536 1534 1444 1273 1069 990 936 853

IRCA 515 = PB 5/51 x MDF 315
IRCA 519 = PB 5/51 x MDF 39

Tous les croisements **W x A** sont réalisés avec PB 260 comme femelle. Les 11 génotypes amazoniens utilisés comme mâles peuvent donc être classés d'après leur aptitude à la combinaison sur PB 260. On voit que les 3 croisements **W x WA** se situent dans la fourchette de variation des familles **W x W**.

Parmi les 82 génotypes sélectionnés dans ce CES, et qui constituent la série IRCA 1300, on compte 8 clones de type **W x WA** et 3 clones de type **W x A**.

3.3. Sélection de la série IRCA 1300 (82 clones numérotés de IRCA 1300 à IRCA 1381) dans le CES 1988.

Sur 2346 seedlings légitimes étudiés, 1665 sont issus de croisements W x W, 569 de croisements W x A et 114 de croisements W x A.

Parmi les 82 clones sélectionnés, 3 sont issus de croisements W x A et 8 de croisements W x WA ; tableau 9 :

Clone IRCA	Type	Origine	Production (g/a)	Note de branchement
1349	W x W	PB 260 x IR 22	45,8	3
1361	W x WA	PB 260 x IRCA 515	24,2	5
1308	W x WA	GT 1 x IRCA 515	16,3	2
1348	W x A	PB 260 x AC/S/11/41	12,5	5
1362	W x WA	PB 260 x IRCA 515	11,5	3
1364	W x WA	PB 260 x IRCA 519	9,6	3
1365	W x WA	PB 260 x IRCA 519	8,8	3
1309	W x WA	GT 1 x IRCA 519	8,8	3
1310	W x WA	GT 1 x IRCA 519	8,5	4
1363	W x WA	PB 260 x IRCA 515	8,1	3
1380	W x A	PB 260 x RO/PB/2/1	3,4	2
1381	W x A	PB 260 x RO/PB/2/1	2,6	4
1379	W x W	PB 260 x AF 261	2,2	5

Production = production cumulée de l'ensemble des tests de sélection.

Note de branchement : 5 = très bon, 1 = médiocre

IRCA 1349 et IRCA 1379 sont respectivement le meilleur et le moins bon producteur de l'échantillon sélectionné.

La famille PB 260 x IRCA 515 était classée troisième pour sa production sur 23 familles étudiées dans le dispositif statistique. La famille PB 260 x IRCA 519 était classée huitième. La famille PB 260 x RO/PB/2/1 était classée dixième.

3.4. Jardin de pollinisation artificielle (BM.OA.40).

Sur une surface de 5 hectares environ, ce champ a été créé dans le but de faciliter pour l'avenir les opérations de pollinisations artificielles trop souvent effectuées sur des arbres en milieu de parcelles, mal exposées à la lumière et d'accès difficile. Un dispositif en lignes jumelées avant grand écartement des interlignes a été retenu.

On constate une bonne reprise des 200 clones présents dans cet essai. 131 clones sont représentés par 10 arbres/clone ; 30 clones sont représentés par 9 arbres ; 19 clones par 8 arbres ; 18 clones par 7 arbres, ou moins.

Cependant, un caractère très évolutif de la composition clonale de ce champ doit être retenu, puisque, selon les résultats obtenus par ailleurs, l'intérêt des génotypes peut varier d'une année à l'autre, ce qui oblige à envisager périodiquement la substitution de certains clones par d'autres.

4. ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX MALADIES DE FEUILLES DU MATERIEL AMAZONIEN.

Un échantillon de 122 clones amazoniens a été mis en test agronomique en 1988, à HEVEGO, dans le Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire. Ces génotypes, issus d'une sélection précoce à deux ans sur leurs valeurs propres de production et de branchement, sont prévus pour servir préférentiellement de parents dans le schéma de création de nouveaux clones à l'IRCA. Ils ont fait l'objet, un an après la mise en place de l'essai, d'une notation de maladies des feuilles.

L'évaluation des attaques vraisemblablement dues à *Colletotrichum* sur les feuilles eut lieu au mois de juillet, un an après la mise en place de l'essai. Deux notes ont été attribuées à chacun des clones (une par répétition) suivant la sévérité des symptômes observés sur le feuillage des dix arbres de ses parcelles unitaires respectives. Le barème de ces notations fut le suivant :

0	:	pas de symptômes apparents.
1	:	apparition de taches brunes sur les feuilles.
2	:	début de nécrose des extrémités des feuilles.
3	:	nécroses prononcées avec chute de quelques feuilles au niveau du bourgeon terminal.
4	:	toutes les feuilles sont tombées à l'exception des anciennes.
5	:	tige totalement nue avec un bourgeon terminal ayant l'aspect brûlé.

Les données ainsi recueillies ont été analysées, pour une partie à HEVEGO et, pour l'autre, à l'INRA d'Orléans, à l'aide de logiciels d'analyse et d'estimation des composantes de la variance de la programmation AMANCE. Elles ont été structurées de sorte que les différences entre clones à l'intérieur des Etats d'une part, entre clones à travers les groupes et sous-groupes génétiques d'autre part aient été étudiées en analyse hiérarchique en modèle mixte.

RESULTATS

Variabilités entre Etats de prospection et entre individus.

Les résultats de l'analyse de variance en modèle hiérarchique entre les facteurs Etats de prospection et clones à l'intérieur de ces Etats figurent dans le tableau 10 :

Tableau 10: Variabilité entre Etats de prospection et entre clones.

Sources de variation	d.d.l.	C.M.	F	Variance	Pourcent.
Etats de prospection	2	48,51	142,67***	0,58 ± 0,18	33,72 %
Clones/Etat	119	1,93	5,65***	0,30 ± 0,008	46,51 %
Résiduelle	122	0,34		0,34 ± 0,002	19,77 %

*** : Différences significatives à 1 %

Les différences entre modalités de chacun des facteurs apparaissent très hautement significatives, avec une variabilité totale pour la plus grande partie expliquée par les différences entre individus, qui représente environ 47 % de la diversité phénotypique observée, contre seulement 20 % aux effets du milieu. Les Etats de prospection contribuent pour 34 % à cette variance totale. Leurs moyennes : 1,76, 1,77 et 3,07 correspondant respectivement à la sensibilité générale des génotypes issus de l' ACRE, du RONDONIA et du MATO-GROSSO, se caractérisent par une plus grande sensibilité au *Colletotrichum*.

Variabilités entre groupes génétiques et entre clones.

Le tableau No. 11 présente les résultats d'une analyse prenant en compte les trois facteurs groupes et sous-groupes génétiques, clones hiérarchisés dans les deux premiers. Pour plus de clarté, les deux modalités du facteur "groupes génétiques" seront appelées **Am1** et **Am2** (**Am** comme **Amazonien**) et les deux sous-groupes numérotés de 1 à 4, chaque groupe en comptant deux.

Tableau 11: Variabilité entre groupes et sous-groupes génétiques, entre clones.

Sources de variation	d.d.l.	C.M.	F	Variance	Pourcent.
Groupes génétiques	1	74,69	6,47 ***	0,53 ± 0,30	29,23 %
Sous-groupes	2	9,57	4,33 **	0,12 ± 0,01	6,63 %
Clones/ssgroupe/groupe	118	1,98	5,82 ***	0,82 ± 0,008	45,30 %
Résiduelle	122	0,34		0,34 ± 0,002	13,79 %

, * : Tests significatifs à 1 % et 1 % , respectivement.

Les différences entre groupes et sous-groupes génétiques sont hautement significatives. Les moyennes estimées de ces facteurs sont égales à 1,69 et 2,80 pour respectivement les deux groupes **Am1** et **Am2**, 1,47, 1,92, 2,48 et 3,14 correspondant dans l'ordre, aux quatre sous-groupes 2, 1, 3 et 4. Les individus, à l'intérieur de ces deux facteurs groupes et sous-groupes, divergent très significativement les uns des autres comme le montre le tableau 12 :

Tableau 12 Composante de la variance intra groupes et sous-groupes génétiques

Sources de variation	d.d.l.	C.M.	F	Variance	Pourcent.
Clones/Groupe 1 (Am1)	60	2,31	6,69***	1,20±0,07	74,07 %
Résiduelle	61	0,42		0,42±0,006	25,93 %
Clones/Groupe 2 (Am2)	60	1,40	5,35***	0,57±0,02	63,67 %
Résiduelle	61	0,26		0,26±0,002	31,33 %
Clones/Sous-groupe 1	29	1,66	4,74***	0,66±0,05	65,35 %
Résiduelle	30	0,35		0,35±0,003	34,65 %
Clones/Sous-groupe 2	30	1,00	5,56***	0,41±0,02	69,49 %
Résiduelle	31	0,18		0,18±0,002	30,51 %
Clones/Sous-groupe 3	31	2,95	3,94***	1,31±0,14	79,38 %
Résiduelle	32	0,33		0,33±0,006	20,12 %
Clones/Sous-groupe 4	23	2,23	4,38***	0,88±0,09	62,86 %
Résiduelle	29	0,52		0,52±0,02	37,14 %

*** : Différences significatives à 1 %.

Dans le premier cas (groupes génétiques **Am1** et **Am2**), ils représentent 69 et 74 % de la variabilité totale observée, contre 26 à 31 % pour la résiduelle.

La situation dans les sous-groupes est la suivante : en tête, le sous-groupe 3 où la variabilité génétique concoure pour presque 80 % aux différences phénotypiques observées, suivi des sous-groupes 2, 1 et 4.

On constate, en comparant **Am1** et **Am2** que le premier comporte plus de variance génétique alors que ses deux sous-groupes constitutifs apparaissent très peu différents sur ce plan. A l'inverse, alors que **Am2** contient le moins de variabilité génétique, ses deux sous-groupes divergent sensiblement. Les individus du RONDONIA, au regard de la part génétique dans le sous-groupe 3 seraient plus éloignés de ceux du MATO-GROSSO qu'ils ne le sont par rapport à leurs homologues de l' ACRE.

DISCUSSION - CONCLUSION

Les résultats des études des sensibilités aux attaques du *Colletotrichum* concordent parfaitement avec ceux obtenus en électrophorèse mono-dimensionnelle.

La variabilité génétique entre les deux groupes **Am1** et **Am2** est supérieure à celle existant entre les sous-groupes. Dans tous les cas, les différences entre individus expliquent la majeure partie de la variabilité phénotypique observée. Les génotypes du RONDONIA sont génétiquement plus proches de ceux de l' ACRE qu'ils ne ressemblent à ceux originaires du MATO-GROSSO pour le caractère mesuré. Aussi leur présence dans le sous-groupe 3 a-t-elle pour conséquence d'y augmenter artificiellement la variabilité génétique comparativement à celle existant dans les autres sous-groupes. Les différences significatives entre moyennes des Etats de prospection constituent un peu la surprise dans les analyses effectuées, aucune réalité biologique n'étant jusque là reconnue ceux-ci, hormis une éventuelle différence phénologique entre les dates de défoliation-refoliation.

Les génotypes du MATO-GROSSO semblent avoir différemment évolué sur le plan génétique et ce, au détriment de leur résistance au *Colletotrichum*, le pathogène étudié dans cette étude.

Malgré cette évolution divergente, les variabilités génétiques internes à ces Etats sont très voisines comment le montre le tableau 13 :

Enfin, on peut considérer que l'échantillon étudié ici se répartit, témoins compris, en 4 grands groupes dont :

- le premier est formé par l'unique clone totalement résistant du RONDONIA, le génotype RO/PB/02/03 ;
- le second se compose d'une soixantaine de clones environ, peu sensibles, dont la moyenne des notations varie entre 0,5 et 2,5 (soit un peu plus de 50 % de l'effectif étudié) ;
- le troisième rassemble 46 génotypes pouvant être considérés comme sensibles (moyenne variant entre 3 et 4,5) ;
- le dernier compte les deux génotypes les plus fortement sensibles, tous deux du MATO-GROSSO : MT/IT/14/01 et MT/A/21/04.

Tableau 13 Composante de la variance entre génotypes à l'intérieur des Etats

Sources de variation	d.d.l.	C.M.	F	Variance	Pourcent.
Clones/Etat 1 (ACRE)	44	1,54	5,31***	0,62±0,03	63,13 %
Résiduelle	45	0,29		0,29±0,004	31,87 %
Clones/Etat 2 (RONDONIA)	31	1,90	5,76***	0,79±0,06	70,54 %
Résiduelle	32	0,33		0,33±0,006	29,46 %
Clones/Etat 3 (MAT-GROS)	44	2,35	5,33***	0,93±0,06	71,01 %
Résiduelle	45	0,40		0,40±0,007	28,99 %

*** : Différences significatives 1 %

5. POLLINISATION LIBRE

Le projet d'amélioration de l'Hévéa dans un schéma de type sélection récurrente, implique la création de jardins de pollinisation libre. Ces jardins seront des populations randomisées d'individus de clones cultivés et amazoniens. Leur mise en place nécessite une meilleure connaissance préalable du régime de reproduction de cette espèce, car l'efficacité du brassage génétique dépend du taux d'autogamie des clones, de l'existence d'incompatibilités entre génotypes et de la distance de propagation du pollen.

Ces trois points sont encore mal connus chez l'Hévéa. On admet habituellement que l'*Hevea brasiliensis* est à dominante allogame. Mais le taux d'allopollinisation dépend certainement de la disponibilité en allopollen. Dans les jardins de pollinisation libre (en quinconce), chaque arbre sera entouré de génotypes tous différents, dont 6 plus proches voisins équidistants ; l'allopollen ne devrait pas être en quantité limitante. Dans ces conditions, il reste à déterminer (1) quelle est le taux de fécondations par l'autopollen et (2) s'il existe des systèmes d'incompatibilité (morphologiques, physiologiques ou génétiques) conduisant à des croisements préférentiels avec certains des génotypes présents.

Il apparaît donc souhaitable, avant la mise en place de ces jardins de pollinisation libre, d'estimer le taux de brassage génétique à l'aide de jardins expérimentaux où l'on puisse identifier la paternité d'une descendance. Pour cela, nous disposons de marqueurs isoenzymatiques applicables, en routine, à de grands échantillons d'individus.

Nous avons sélectionné, dans la base d'identification clonale par isozymes (clones Wickham et prospections), les combinaisons de systèmes enzymatiques fournissant le plus possible de génotypes homozygotes différents. Avec la combinaisons des 3 systèmes enzymatiques (3 gènes) : estérase (EST), leucine amino-peptidase (LAP) et shikimate déshydrogénase (SKD), on obtient 19 génotypes différents (tableau 15).

Dix-neuf arbres, correspondant chacun à un des 19 génotypes, seront plantés selon des dispositions à définir en fonction de la question posée (taux d'autofécondation, distance de pollinisation ...). Pour certains des génotypes, il existe plusieurs clones possibles ; le choix pourra se faire, si l'information existe, en fonction de leur aptitude à la fructification et pour synchroniser la floraison. Pour chaque descendant d'un arbre donné, il sera possible d'identifier son parent mâle en établissant sa composition allélique, pour les trois loci enzymatiques retenus (EST, LAP et SKD).

CLONES	LAP	EST	SKD	CLONES	LAP	EST	SKD	CLONES	LAP	EST	SKD
224 AC	22	11	33	354 MT	33	44	33	110 AC	66	11	22
297 AC	22	11	33	347 MT	33	66	33	311 AC	66	11	33
295 AC	22	11	33	344 MT	33	66	33	R053	66	11	33
IAN45/717	22	11	33	351 MT	44	11	33	218 RO	66	11	33
PB 24	22	11	33	381 RO	44	11	33	396 RO	66	11	33
OY 1	22	11	33	RRIC 4	44	11	33	62 AC	66	11	33
GT 1	22	11	33	PB 254	44	11	33	325 AC	66	11	33
188 RO	22	11	33	PR 107	44	11	33	45 AC	66	11	33
GU1296	22	11	33	3 AC	44	11	55	191 RO	66	11	33
FDR79	22	11	33	134 MT	44	44	33	17 AC	66	11	33
383 RO	22	11	33	127 MT	44	66	33	58 AC	66	11	33
77 AC	22	11	33	363 MT	44	66	33	205 RO	66	11	33
HARBEL 60	22	11	33	165 MT	44	66	33	184 RO	66	11	33
RRIM 607	22	11	33	159 MT	44	66	33	194 RO	66	11	33
29 AC	22	11	55	361 MT	44	66	33	329 AC	66	11	33
IAN6500	22	66	33	364 MT	44	66	33	91 AC	66	11	33
HARBEL 61	22	66	33	116 AC	66	11	55	282 AC	66	11	33
166 MT	22	66	33	398 RO	66	11	55	54 AC	66	11	33
RRIM 701	22	66	33	206 RO	66	11	55	186 RO	66	11	33
164 MT	22	66	33	RO60	66	11	55	207 RO	66	11	33
157 MT	22	66	33	10 AC	66	11	55	235 AC	66	11	33
RRIM 603	22	66	33	324 AC	66	11	66	42 AC	66	11	33
RRIM 707	22	66	33	399 RO	66	11	66	109 AC	66	11	33
TB 28	22	66	33	276 AC	66	11	66	392 RO	66	11	33
RRIM 612	22	66	33	112 AC	66	33	66	69 AC	66	11	33
PR 261	22	66	33	328 AC	66	44	33	232 AC	66	11	33
IR 35	22	66	33	140 MT	66	66	22	5 AC	66	11	33
				360 MT	66	66	33	334 AC	66	11	33
				147 MT	66	66	33	308 AC	66	11	33
				156 MT	66	66	33	MDF38	66	11	33
				F4506	66	66	44	387 RO	66	11	33
								391 RO	66	11	33
								55 AC	66	11	33
								AC74	66	11	33
								323 AC	66	11	33
								375 RO	66	11	33
								237 AC	66	11	33
								61 AC	66	11	33
								231 AC	66	11	33
								195 RO	66	11	33
								236 AC	66	11	33
								114 AC	66	11	33
								289 AC	66	11	44
								113 AC	66	11	44
								320 AC	66	11	44
								220 AC	66	11	44
								108 AC	66	11	44

Tableau 14: Liste des clones correspondants aux 19 génotypes, pour 3 systèmes enzymatiques : Estérase (EST), Leucyl amino-peptidase (LAP) et Shikimate déshydrogénase (SKD).

6. DIVERSITE GENETIQUE

Dans le cadre de ce contrat STD2, l'estimation de la variabilité génétique a été définie comme préalable à un programme d'amélioration génétique de populations de clones d'Hévéa (sélection récurrente). L'analyse du polymorphisme génétique a été entreprise à l'aide de marqueurs moléculaires.

6.1. Isozymes

La diversité génétique au sein du Germplasm de *Hevea brasiliensis* a d'abord été étudiée, à Montpellier, à l'aide des marqueurs isozymiques. Douzes systèmes enzymatiques ont permis de révéler la variabilité de 15 gènes au total. La variabilité allélique révélée a souligné l'importance de l'élargissement des ressources génétiques apporté par les prospections (Schultes, 1974 et IRRDB 1981) par rapport à la variabilité des clones cultivés (clones Wickham). Une étude portant sur 405 clones issus de la prospection amazonienne de 1981 a révélé une différenciation génétique des clones coïncidant en partie avec leur origine géographique.

6.2. RFLP - ADN Nucleaire

Parallèlement, depuis le début de l'année 1990, la technique de RFLP a été développée au laboratoire IRCA-AGETROP de Montpellier pour l'obtention de marqueurs génétiques nucléaires. Le premier intérêt des RFLP nucléaires, par rapport aux RFLP mitochondriaux et aux isozymes, est de permettre l'accès à un nombre potentiellement illimité de marqueurs à hérédité mendélienne. La possibilité de couvrir la variabilité de l'ensemble du génome nucléaire, doit conduire à une meilleure représentation de la diversité.

6.2.1. Etat des techniques

Le premier travail a consisté dans la mise au point des extractions de l'ADN total d'Hévéa. L'utilisation du protocole de Dellaporta (Dellaporta et al., 1983. Plant Biology Reporter. 1(4), 19-21) modifié, permet d'obtenir de l'ADN total suffisamment purifié et non dégradé, pour une vingtaine d'individus en une journée de manipulations (Photo 1).

L'ADN peut être extrait à partir de feuilles fraîches ou lyophilisées, ou simplement séchées à l'étuve comme cela avait été montré pour les expériences sur l'ADN cytoplasmique d'Hévéa à Louvain. Les feuilles séchées constituent un matériel très avantageux : facile à prélever en dehors de la courte période de défoliation, simple à préparer (séchage et ensachage) et facile à transporter. Ceci simplifie considérablement l'approvisionnement en matériel végétal en provenance des collections de l'IRCA Côte d'Ivoire. De ce fait, il n'est pas utile de chercher à mettre au point d'autres protocoles d'extraction d'ADN, à partir d'autres matériel (autre organe...)

La technique de RFLP est, maintenant, également maîtrisée. L'ADN d'Hévéa est suffisamment pur pour être totalement digéré par des enzymes de restriction (Photo 2). Les expériences de transfert de l'ADN digéré (Southern) et d'hybridations ont été d'abord testées à l'aide de sondes hétérologues. La photo 3 montre le profil d'hybridation de différents clones d'Hévéa avec une sonde d'ADNr de blé (sonde PTA71, Gerlach and Bedbrook 1979. Nucleic Acids Res., 7(7), 1869-1885).

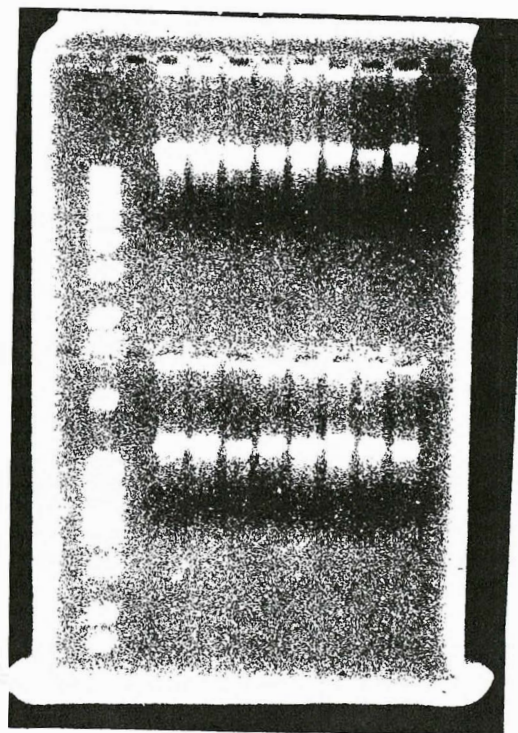


PHOTO 1: ADN total d'Hévéa non digéré.
(Feuilles prélevées en Cote d'Ivoire et séchées à l'étuve)

HAE III, EcoRV, DraI , RsaI

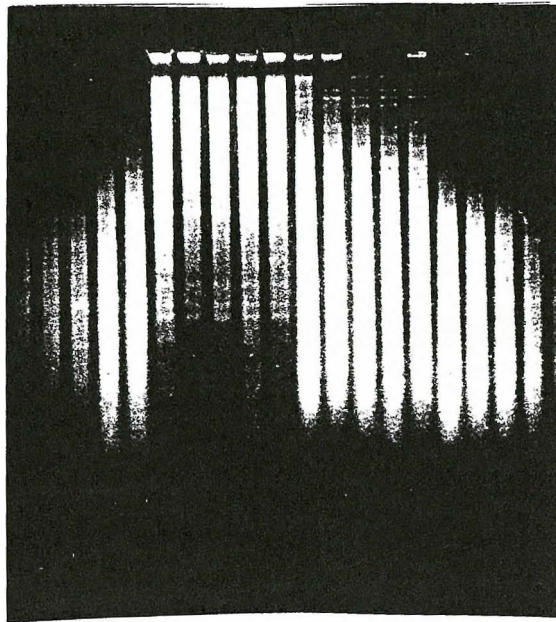


Photo 2:

**ADN total d'Hévéa digéré par les enzymes HAE III,
EcoRV, DraI , RsaI**

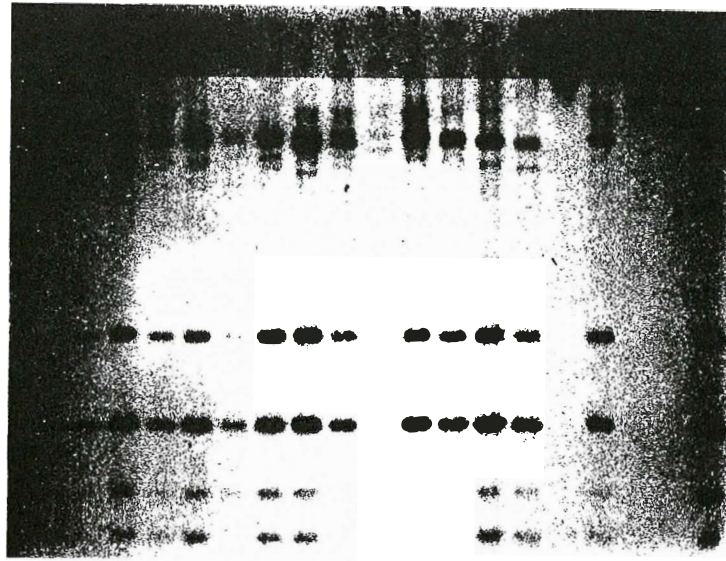


Photo 3:

Exemple de profils obtenus par hybridation de l'ADN de différents clones #d'Hévéa Brasiliensis# à l'aide d'une sonde d'ADN ribosomique de blé autoradiographie piquage radioactif au P³²

6.2.2. Application à l'étude de la diversité

Pour l'étude de la diversité, il est nécessaire de recourir à un grand nombre de sondes d'ADN, correspondant de préférence à des séquences uniques (à déterminisme génétique simple). Au laboratoire, à Montpellier, a été entreprise la construction d'une banque d'ADN génomique d'Hévéa. Le protocole suivi visait à obtenir une banque enrichie en ADN nucléaire et en sondes correspondant à des séquences uniques. La banque obtenue constitue une source d'environ 500 sondes homologues "uniques" potentielles selon de premières estimations. La caractérisation de cette banque génomique se poursuit et le travail à venir consistera à tester le polymorphisme génétique révélé par ces sondes sur des clones issus de prospections.

6.3. RFLP - ADN Mitochondrial

6.3.1. MATERIEL ET METHODES

6.3.1.1. Echantillons analysés

L'extraction d'ADN total a été réalisée à partir de feuilles d'hévéa lyophilisées. Le RFLP mitochondrial a été détecté pour 163 clones d'hévéa constituant un échantillonnage de la prospection amazonienne de 1981 et disponible à Montpellier. Chacun de ces clones appartient à des populations différentes des trois états du Brésil prospectés : l'Acre, le Rondonia et le Mato Grosso. Au total, nous avons ainsi disposé de 111 clones de l'Acre, 23 du Rondonia et 29 du Mato Grosso (Tableau 1). Dans la suite de ce travail, les clones seront repris suivant leur code (Tableau 1) reprenant l'état d'origine (première lettre) et le numéro d'ordre.

Tous les échantillons ont été lyophilisés à Montpellier.

6.3.1.2. Extraction d'ADN total

L'ADN total de l'hévéa a été préparé à partir des feuilles lyophilisées par la méthode au bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) (Rogers & Bendich, 1988). 0.1 g de feuilles lyophilisées sont placées dans un mortier refroidi par de l'azote liquide et broyées grâce à un pilon, jusqu'à l'obtention d'une fine poudre sans résidus de feuilles apparents.

Cette poudre est ensuite transférée dans un tube Eppendorf stérile (1.5 ml) contenant 1 ml de tampon 1 x CTAB (bromure de cétyltriméthylammonium 1 % (P/V), Tris 50 mM, pH 8.0 (HCl), EDTA 10 mM, NaCl 0.7 M, polyvinylpyrrolidone 0.5 % (P/V)) préchauffé à 65°C. Après agitation, le mélange est mis à incuber à 65°C pendant 5 min puis divisé en deux fois

Tableau 15 - Liste des clones prospectés dans le bassin amazonien (1981)

ETAT	DISTRICT	LOCALITE	CLONE	ETAT	DISTRICT	LOCALITE	CLONE	ETAT	DISTRICT	LOCALITE	CLONE
AC	T	01	05	AC	S	11	27	AC	X	21	12
AC	T	01	15	AC	S	11	57	AC	X	21	15
AC	T	01	16	AC	S	12	02	AC	X	21	18
AC	T	01	22	AC	S	12	03	RO	JP	03	22
AC	T	02	02	AC	S	12	04	RO	JP	03	26
AC	T	02	04	AC	S	12	05	RO	JP	03	32
AC	T	02	08	AC	S	12	08	RO	OP	04	01
AC	T	02	10	AC	S	12	11	RO	J	05	04
AC	T	03	01	AC	S	12	12	RO	J	05	08
AC	T	03	12	AC	S	12	22	RO	J	05	19
AC	T	04	06	AC	S	12	43	RO	J	05	21
AC	T	04	17	AC	S	12	45	RO	J	06	08
AC	T	04	19	AC	S	13	02	RO	J	06	11
AC	T	04	23	AC	S	13	04	RO	A	07	17
AC	T	04	24	AC	S	13	07	RO	C	08	09
AC	T	04	26	AC	S	13	16	RO	C	08	46
AC	F	05	13	AC	B	15	02	RO	C	09	04
AC	F	05	14	AC	B	15	07	RO	C	09	20
AC	F	05	15	AC	B	15	11	RO	C	09	34
AC	F	05	16	AC	B	15	41	RO	CM	10	35
AC	F	05	17	AC	B	17	05	RO	CM	10	43
AC	F	05	25	AC	B	17	06	RO	CM	10	71
AC	F	06	04	AC	B	17	08	RO	CM	11	87
AC	F	06	08	AC	B	17	09	RO	CM	12	13
AC	F	06	10	AC	B	18	05	RO	CM	12	19
AC	F	06	12	AC	B	18	07	MT	C	01	10
AC	F	06	18	AC	B	18	10	MT	C	02	10
AC	F	06	22	AC	B	18	11	MT	C	02	17
AC	F	06	28	AC	B	19	03	MT	C	02	45
AC	F	07	07	AC	B	19	04	MT	C	04	13
AC	F	07	18	AC	B	19	05	MT	C	04	30
AC	F	07	24	AC	B	19	06	MT	C	05	11
AC	F	07	27	AC	B	19	07	MT	C	05	12
AC	F	07	34	AC	B	19	08	MT	C	05	19
AC	F	GA	18	AC	B	19	11	MT	C	06	02
AC	G	05	19	AC	B	19	66	MT	C	06	25
AC	S	08	12	AC	B	19	79	MT	C	09	08
AC	S	08	78	AC	X	20	05	MT	C	10	07
AC	S	08	84	AC	X	20	07	MT	C	11	04
AC	S	08	89	AC	X	20	08	MT	C	11	05
AC	S	08	93	AC	X	20	09	MT	IT	13	12
AC	S	09	02	AC	X	20	10	MT	IT	13	18
AC	S	09	11	AC	X	20	14	MT	IT	14	02
AC	S	10	05	AC	X	20	15	MT	IT	14	25
AC	S	10	06	AC	X	20	24	MT	IT	15	30
AC	S	10	08	AC	X	20	27	MT	IT	16	70
AC	S	10	10	AC	X	20	31	MT	IT	17	21
AC	S	10	11	AC	X	20	32	MT	IT	17	22
AC	S	10	14	AC	X	20	33	MT	A	19	02
AC	S	10	16	AC	X	21	02	MT	A	19	03
AC	S	11	02	AC	X	21	03	MT	A	23	01
AC	S	11	05	AC	X	21	04	MT	VB	25A	04
AC	S	11	17	AC	X	21	08	MT	VB	25A	07
AC	S	11	25	AC	X	21	10	MT	VB	25A	11

500 μ l dans deux tubes Eppendorf stériles à chacun desquels sont ajoutés 500 μ l d'une solution chloroforme/alcool isoamylique (24:1) pour dénaturer et précipiter les protéines. Après agitation, les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min à température ambiante. Chaque phase aqueuse est transférée dans un tube Eppendorf stérile contenant 50 μ l de solution CTAB 10 % (P/V), NaCl 0.7 M, préchauffé à 65 °C. Après agitation et incubation à 65°C pendant 5 min, la solution est traitée par le chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Après centrifugation, les phases aqueuses de chaque tube sont réunies dans un seul tube Eppendorf stérile auquel est ajouté un volume égal de la solution de CTAB de précipitation (CTAB 1 % (P/V), Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0, HCl) préchauffé à 65°C. Après une centrifugation de 10 min à 13000 rpm, le culot des complexes CTAB-acides nucléiques est solubilisé dans 300 μ l de solution TE high-salt (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, NaCl 1 M, pH 8.0) préchauffé à 65°C puis les acides nucléiques sont précipités par 600 μ l d'éthanol à -20°C pendant 2 h. Après une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min (4°C), le culot est lavé par de l'éthanol 70 % (-20°C) avant d'être séché sous vide pendant 5 min et finalement remis en suspension dans 80 μ l de tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5, HCl).

Cette méthode permet d'obtenir 0.5~0.7 μ g d'ADN total par mg de feuilles lyophilisées.

6.3.1.3. Restriction d'ADN total et électrophorèse

5 μ g d'ADN total sont incubés pendant 4 h à 37°C dans 25 μ l de milieu de digestion contenant de 10 unités d'enzyme (*Eco*RI ou *Hind*III) selon les recommandations du fournisseur. La réaction est arrêtée par l'ajout de 2.5 μ l de milieu d'arrêt (Ficoll 15 % (P/V), EDTA 0.35 M, pH 7.8 (NaOH), bleu de bromophénol 0.01 % (P/V)). Les fragments de restriction

sont séparés suivant leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose 0.9 %, 1 x TBE contenant 0.2 µg/ml de bromure d'éthidium. Après une migration de 16 h à 35 volts, les gels sont photographiés sous rayonnements UV à 300 nm avec un film Polaroid de type 665 P/N (filtre Wootten n°23A). L'ADN de phage lambda digéré par *EcoRI* et *HindII* sert de marqueur pour la détermination des poids moléculaires.

6.3.1.4. Transfert de l'ADN sur la membrane de nylon par Southern blot

Après l'électrophorèse, une dépurination partielle de l'ADN est obtenue par deux traitements de 15 min dans une solution d'HCl 0.24 N ; ensuite l'ADN est dénaturé dans le milieu NaOH 0.5 N, NaCl 0.6 M pendant 30 min. Ensuite, une neutralisation est effectuée en mettant le gel dans un tampon NaCl 1.5 M, Tris 0.5 M, pH 7.5 (HCl) pendant 30 min d'agitation. Le gel est finalement mis en contact avec une membrane en nylon Hybond N⁺ (Amersham) et le transfert de l'ADN est réalisé pendant 16-24 h selon les indications du fournisseur. Après le transfert, la membrane est lavée 2 min dans une solution de NaOH 0.4 N et ensuite dans une solution de 5 x SSC pendant 1 min puis séchée entre papiers de Whatman 3 MM.

6.3.1.5. Hybridation de l'ADN

6.3.1.5.1. Préparation de l'ADN plasmidial

Les clones d'*E. coli* contenant le plasmide pTZ19R recombinant choisi parmi la banque d'ADN mitochondrial de féverole (*Vicia faba* L.) sont maintenus en culture sur milieu solide LB en présence d'ampicilline. L'extraction de l'ADN se fait par lyse alcaline suivant la méthode décrite par Sambrook et al. (1989). Des cultures de 1.5 ml de milieu LB amp sont inoculées et ensuite incubées à 37°C pendant 16 h sous agitation vigoureuse.

La culture est transférée dans un tube Eppendorf stérile et centrifugée à 1300 rpm pendant 1 min (4°C). Le culot est resuspendu dans 100 µl d'une solution froide EDTA 10 mM, glucose 50 mM, Tris 25 mM, pH 8.0 (HCl). Les cellules bactériennes sont alors lysées par l'ajout de 100 µl d'une solution NaOH 0.15 N, SDS 1 % (P/V), fraîchement préparée. Après l'ajout de 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 3 M et une incubation dans de la glace pendant 5 min, une centrifugation est effectuée à 13000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est extrait par un volume de phénol/chloroforme (1:1) puis mélangé à 1 ml d'éthanol 100 % (-20°C). Après incubation de 2 min et une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min (température ambiante), les acides nucléiques sont lavés par de l'éthanol 70 % (-20°C) avant d'être séchés sous vide pendant 5 min et finalement remis en suspension dans 50 µl de solution TE.

6.3.1.5.2. Marquage radioactif de la sonde

L'ADN plasmidial contenant l'insert d'intérêt est marqué par le ^{32}P suivant les méthodes de Nick-translation ou de Random-Priming à l'aide des kits BRL et Amersham respectivement. La réaction de marquage se fait à partir de 4 µl d'une préparation brute d'ADN plasmidial selon les conditions des fournisseurs sauf que les volumes conseillés sont divisés par deux. Après l'addition de 10 µl d'une solution d'arrêt (SDS 10 % (P/V), bleu dextran 1 % (P/V)), la sonde radioactive est séparée des nucléotides non incorporés par filtration moléculaire sur une colonne de Sephadex G50 (Pharmacia) équilibrée par du TE.

6.3.1.5.3. Hybridation moléculaire et autoradiographie

La préhybridation et l'hybridation sont réalisées dans un sac de surgélation en plastique thermo-soudé. Les filtres de nylon sont préhybridés de 4 h à une nuit à 42°C dans 0.080 ml de tampon par cm^2 contenant de la formamide désionisée 50 % (V/V), 6 x SSC (1 x SSC : citrate de sodium

0.015 M, NaCl 0.15 M), 5 x Denhardt (100 x Denhardt : Ficoll 2 %, PVP 2 %, BSA 2 %), SDS 1 % et de l'ADN de sperme de hareng 100 µg/ml dénaturé 10 min à 100°C. L'hybridation se déroule pendant 20-24 h à 42°C dans le milieu de préhybridation réduit à 0.02 ml par cm² auquel on ajoute la sonde radioactive (4 x 10⁶ cpm/ml) dénaturée 10 min à 100°C. Les membranes sont ensuite soumises à deux lavages de 5 min à la température ambiante dans une solution de 2 x SSC, SDS 0.1 % puis un lavage de 15 min à 50°C dans la même solution et finalement deux lavages de 15 min dans 1 x SSC, SDS 0.1 % à 50°C. Le blot est ensuite partiellement séché entre papiers de Whatman et mis en contact avec un film X-OMAT-AR KODAK dans une cassette d'autoradiographie munie d'un écran amplificateur. Après une exposition de 4 à 7 jours à -70°C, le film est révélé selon les indications du fournisseur.

6.3.1.5.4. Déshybridation des membranes

La sonde peut être déshybridée pour autant que la membrane n'ait pas été entièrement séchée avant d'être mise à l'autoradiographie. La déshybridation est réalisée par un lavage de 30 min à 42°C dans une solution de NaOH 0.4 N. La membrane est alors incubée pendant 30 min à 42°C dans une solution Tris 0.2 M, pH 7.5 (HCl), 0.1 x SSC, SDS 0.1 % (P/V), ensuite séchée entre papier de Whatman. La membrane peut être utilisée pendant plusieurs cycles d'hybridation.

6.3.2. RESULTATS

6.3.2.1. Choix de fragments d'ADN mitochondrial de féverole (*Vicia faba* L.) pour les sondes d'hybridation

Une série de clones isolés d'une banque d'ADN mitochondrial de féverole construite dans ce laboratoire (Scheepers et al., 1990) a été employée pour la fabrication de sondes radioactives. Les fragments résultant de la digestion de l'ADN mitochondrial par l'endonucléase de restriction *HindIII* ont été clonés dans le vecteur plasmidial pTZ19R et transférés dans des cellules compétentes de bactéries *Escherichia coli*. Les clones sont pris au hasard dans la banque et finalement 13 clones sont retenus comme sondes selon les signaux d'hybridation obtenus après hybridation avec l'ADN total d'hévéa (Tableau 2).

Tableau 16 - Clones isolés d'une banque mitochondriale de féverole et destinés à la fabrication des sondes radioactives

N° clone	Taille de l'insert (kb)
25	1.98
48	3.60
61	1.92
69	3.25
106	2.25
110	6.50
113	1.56
120	4.30
121	2.40
125	1.61
129	1.70
147	1.90
161	1.60
Somme :	34.52

Les clones retenus ont été répartis en 5 mélanges M1, M2, M3, M4, M5 hybridés avec de l'ADN total digéré par *EcoRI*

ou *HindIII* (Tableau 3). Pour chaque mélange, l'ADN des différents clones est mélangé avant le marquage.

Tableau 17- Mélange différents des clones utilisés respectivement pour l'analyse des RFLP

Mélange	Clone n°	Endonucléases de restriction
M1	25	<i>EcoRI</i>
	61	
	113	
	125	
M2	120	<i>EcoRI</i>
	129	
	147	
M3	48	<i>EcoRI</i> <i>HindIII</i>
	69	
	110	
	153	
M4	25	<i>HindIII</i>
	113	
	129	
	147	
M5	61	<i>HindIII</i>
	106	
	120	
	121	
	125	
	161	

6.3.2.2. Comparaison d'une hybridation obtenue avec un fragment d'ADN séparé ou non du vecteur plasmidique

Afin d'évaluer la nécessité de purifier l'insert d'ADN mitochondrial du clone recombinant, nous avons réalisé une hybridation avec, comme sonde, de l'ADN plasmidial dans sa totalité ou l'insert séparé du vecteur. L'insert d'ADN mitochondrial est dégagé du vecteur pTZ19R par

l'endonucléase *HindIII* et purifié suivant la procédure décrite par Heery, Grannon et Powell (1990). Les marquages radioactifs sont réalisés en utilisant le kit Random Priming. Les résultats montrés à la Figure 1 indiquent que l'intensité et la clarté sont plus ou moins égales avec les deux types de sonde. L'ADN résultant d'une "miniprep" peut donc être marqué directement sans que la purification de l'insert soit nécessaire.

6.3.2.3. Choix de la méthode de marquage

Deux méthodes de marquage radioactif des fragments d'ADN (Nick-translation et Random Priming) ont été comparées dans les mêmes conditions d'hybridation. Les autoradiographies rapportées à la Figure 2 indiquent clairement que les sondes marquées par ces deux méthodes révèlent de la même manière les fragments d'ADN mitochondrial d'hévéa transférés sur la membrane. Dans nos expériences ultérieures, nous avons utilisé la Nick-translation, cette méthode étant moins coûteuse.

6.3.2.4. Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) du génome mitochondrial chez l'hévéa

Nous avons analysé 163 génotypes d'hévéa issus de la collection maintenue à Montpellier. L'ADN préparé à partir de chacun de ces génotypes a été restreint par l'enzyme *EcoRI* et *HindIII* séparément et analysé par hybridation avec chacun des 6 mélanges de sondes. La Figure 3 donne un exemple de coloration de l'ADN total après l'électrophorèse (3-1 et 3-2) et des fragments d'ADN mitochondrial révélés après l'hybridation et l'autoradiographie (3-3 à 3-8). De nombreuses bandes d'hybridation se retrouvent chez la plupart des clones avec cependant des signaux spécifiques à l'un ou l'autre clone.

A partir de l'ensemble des autoradiographies, les fragments d'hybridation ont été étiquetés suivant l'ordre alphabétique par ordre décroissant de leur taille déterminée par rapport aux marqueurs de poids moléculaire. Les types mitochondriaux ont ensuite été définis à partir d'une analyse qualitative basée sur la non-identité des profils d'hybridation.

Nous avons ainsi analysé les 163 clones d'hévéa et obtenu 61 types mitochondriaux différents. Cette classification est reprise au Tableau 4.

La plupart des types sont homogènes suivant l'état d'origine. Dans les trois exceptions (génotype 50, 51 et 52), quelques clones du Rondonia et du Mato Grosso sont classifiés comme le même génotype. Précisons cependant que les clones sont originaires de districts adjacents. D'autres sondes et d'autres enzymes pourraient être utilisées pour augmenter le polymorphisme parmi les types rassemblant beaucoup de clones.

A partir du Tableau 4, on peut encore observer que, parmi les clones des trois états, ceux du Rondonia montrent la variabilité la plus forte (15 génotypes à partir de 23 clones) suivis par les clones du Mato Grosso (13 génotypes à partir de 29 clones) ; les clones de l'Acre montrent la variabilité la plus faible (36 génotypes à partir de 11 clones). Il serait donc intéressant d'analyser un nombre plus important de génotypes provenant du Mato Grosso et du Rondonia pour confirmer la plus grande variabilité dans ces états. Par ailleurs, à partir d'une matrice reprenant les fragments communs entre les différents génotypes, nous estimerons, suivant différentes méthodes, les distances évolutives et les relations phylogénétiques entre ces génotypes.

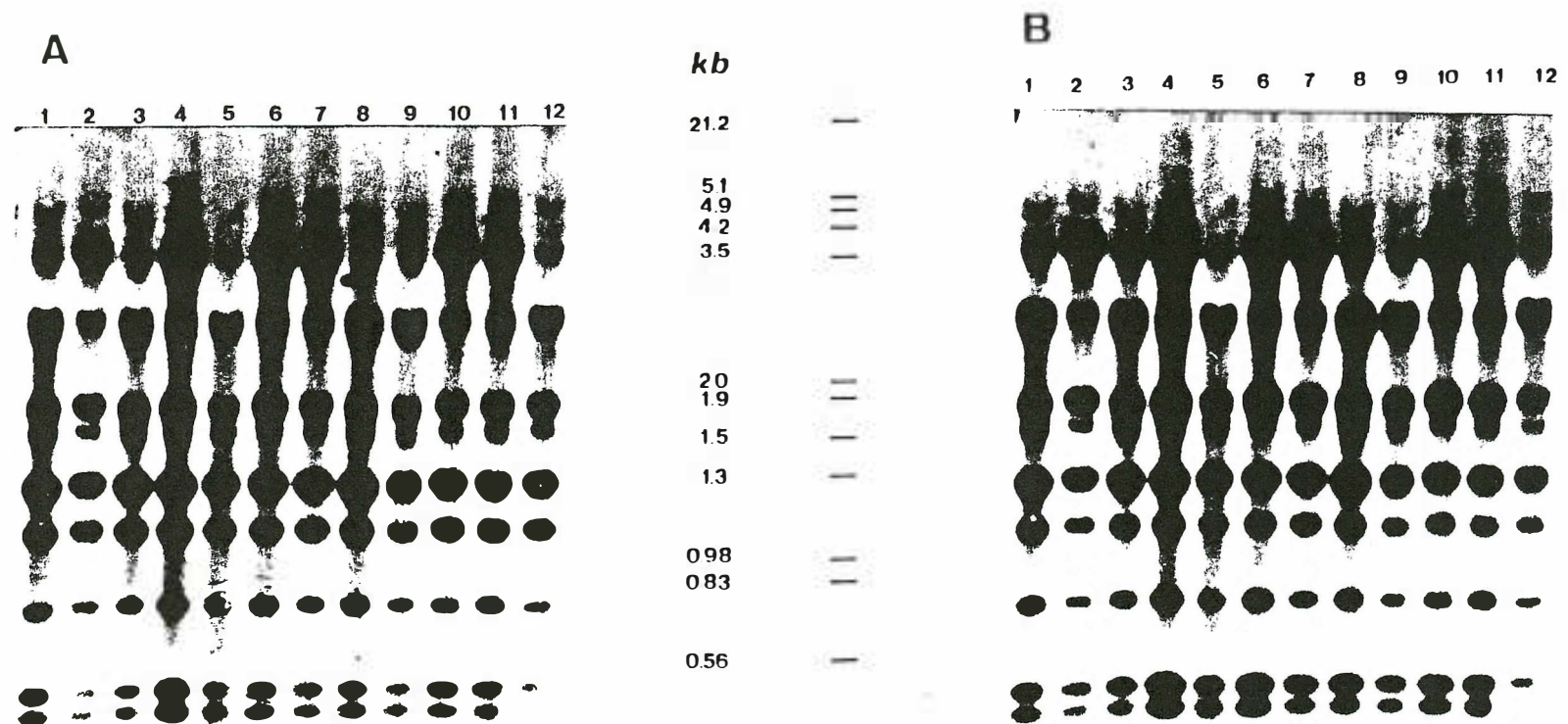


Figure 1 - Effet de la pureté de l'ADN utilisé comme sonde.

10 ug d'ADN total de 12 clones d'hévéa ont été préparés et restreints par l'endonucléase *EcoRI* et transférés sur une membrane de nylon, comme décrit dans "Matériel et Méthodes". Les sondes provenant du mélange M1 sont issues d'ADN dont l'insert a été séparé (A) ou non (B) du vecteur. Les chiffres de 1 à 12 indiquent les différents génotypes évalués dans cette analyse. 1 : AC-F-05-14 ; 2 : AC-X-20-15 ; 3 : AC-F-6A-04 ; 4 : AC-S-12-43 ; 5 : AC-T-01-05 ; 6 : AC-B-15-11 ; 7 : AC-S-10-05 ; 8 : AC-T-04-17 ; 9 : AC-B-17-08 - 10 : AC-X-20-10 ; 11 : AC-S-12-05 ; 12 : AC-T-02-08.

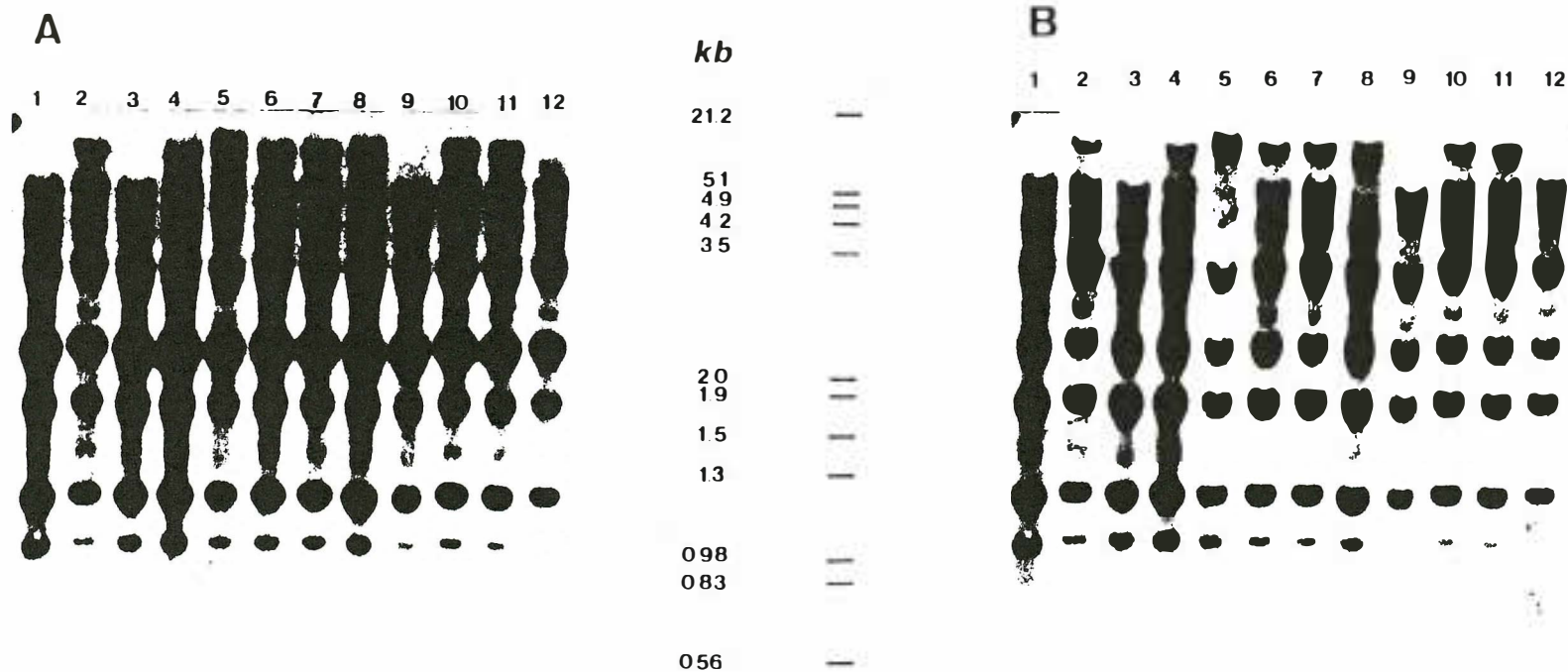


Figure 2 - Comparaison de l'hybridation de l'ADN total d'hévéa avec les sondes marquées par Nick-translation et Random-Priming. 10 μ g d'ADN total de 12 clones d'hévéa ont été préparés et restreints par l'endonucléase *EcoRI* et transférés sur une membrane de nylon, comme décrit dans "Matériel et Méthodes". Les sondes issues du mélange M3 ont été marquées par Random Priming (A) ou Nick-translation (B). La figure représente l'autoradiogramme. Les chiffres de 1 à 12 indiquent les différents géotypes comme à la figure 1.

Figure 3 - Exemple de polymorphisme de l'ADN mitochondrial d'hévéa. L'ADN total des différents géotypes d'hévéa a été préparé à partir de feuilles lyophilisées comme décrit dans la partie "Matériel et Méthodes". 5 μ g ont été restreints par l'endonucléase *EcoRI* (3-1) ou *HindIII* (3-2) et analysés par électrophorèse en gel d'agarose 0.9 %. Le polymorphisme de longueur de fragments de restriction a été détecté par hybridation indépendante avec plusieurs mélanges de sondes : M1 (3-3), M2 (3-4), M3 (3-5 et 3-8), M4 (3-6), M5 (3-7). Les chiffres de 1 à 25 indiquent les différents géotypes évalués dans cette analyse. M : marqueurs de poids moléculaire (phage lambda coupé par *EcoRI* et *HindIII*), 21.35, 5.15, 4.97, 4.28, 3.53, 2.03, 1.90, 1.58, 1.33, 0.98, 0.83, 0.56 kb (de haut en bas). 1 : MT-IT-16-70 ; 2 : MT-C-11-5 ; 3 : MT-IT-13-12 ; 4 : MT-IT-17-21 ; 5 : MT-IT-15-30 ; 6 : MT-C-02-17 ; 7 : MT-IT-14-25 ; 8 : MT-C-04-13 ; 9 : MT-C-02-45 ; 10 : MT-VB-25A-11 ; 11 : MT-VB-25A-04 ; 12 : MT-A-19-03 ; 13 : MT-C-05-11 ; 14 : RO-CM-10-89 ; 15 : RO-C-08-46 ; 16 : RO-J-05-08 ; 17 : RO-CM-12-19 ; 18 : RO-CM-10-35 ; 19 : RO-JP-03-32 ; 20 : RO-C-09-34 ; 21 : RO-J-05-04 ; 22 : RO-C-09-04 ; 23 : RO-JP-03-26 ; 24 : RO-J-06-08 ; 25 : RO-J-05-21.

Figure 3-1

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

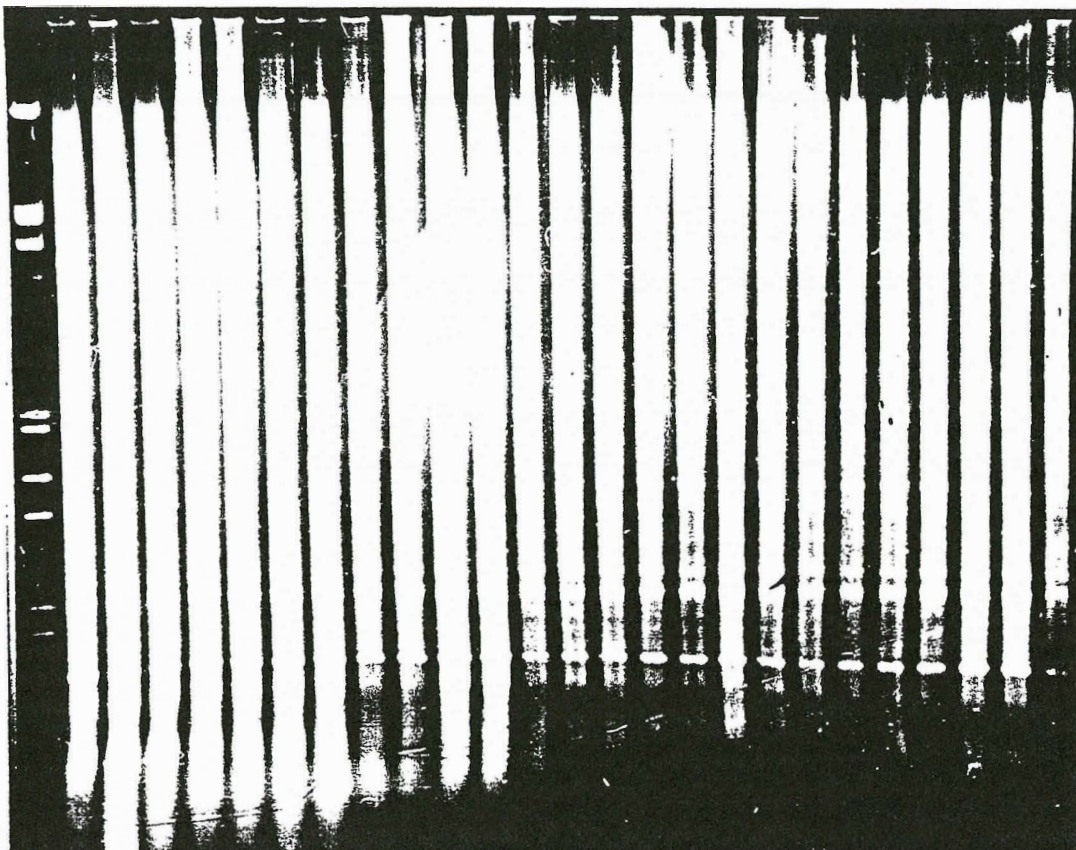


Figure 3-2

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

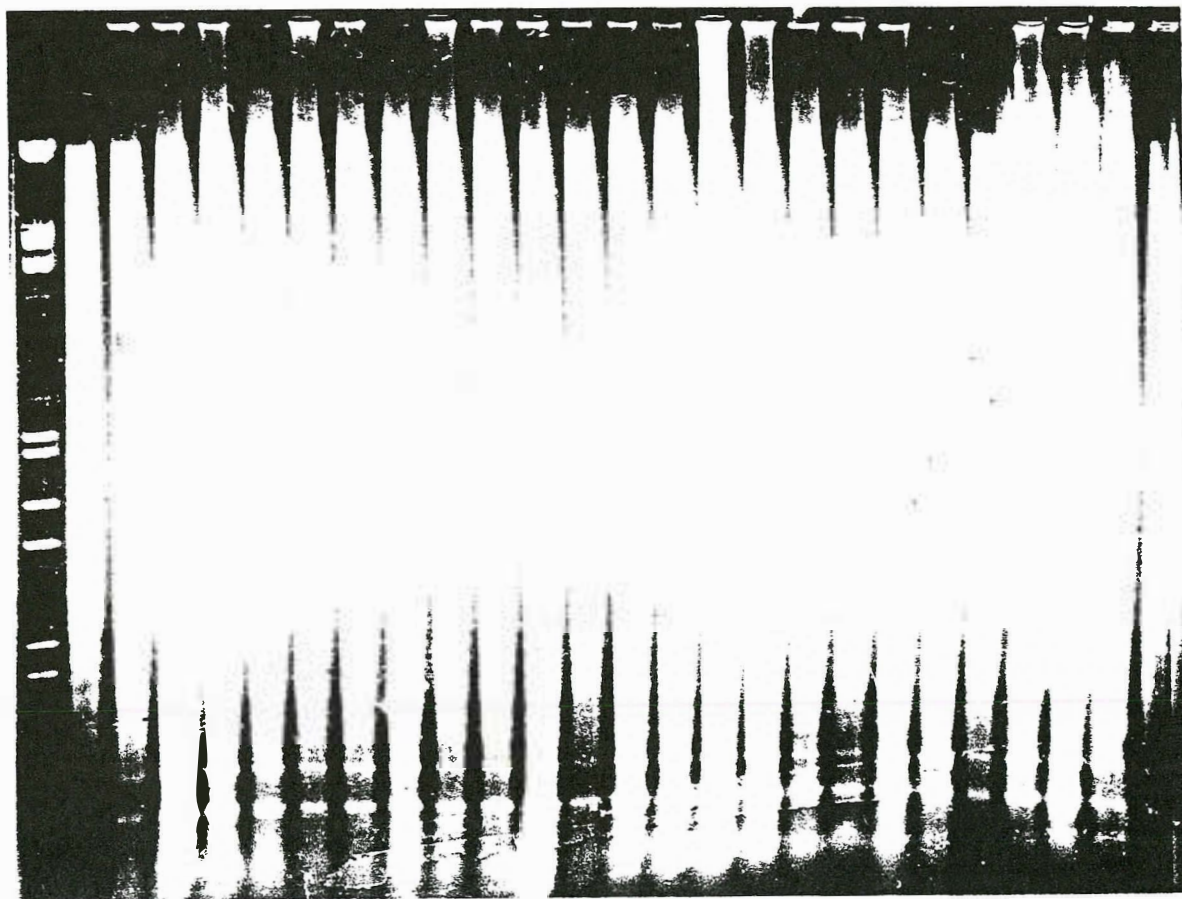


Figure 3-3

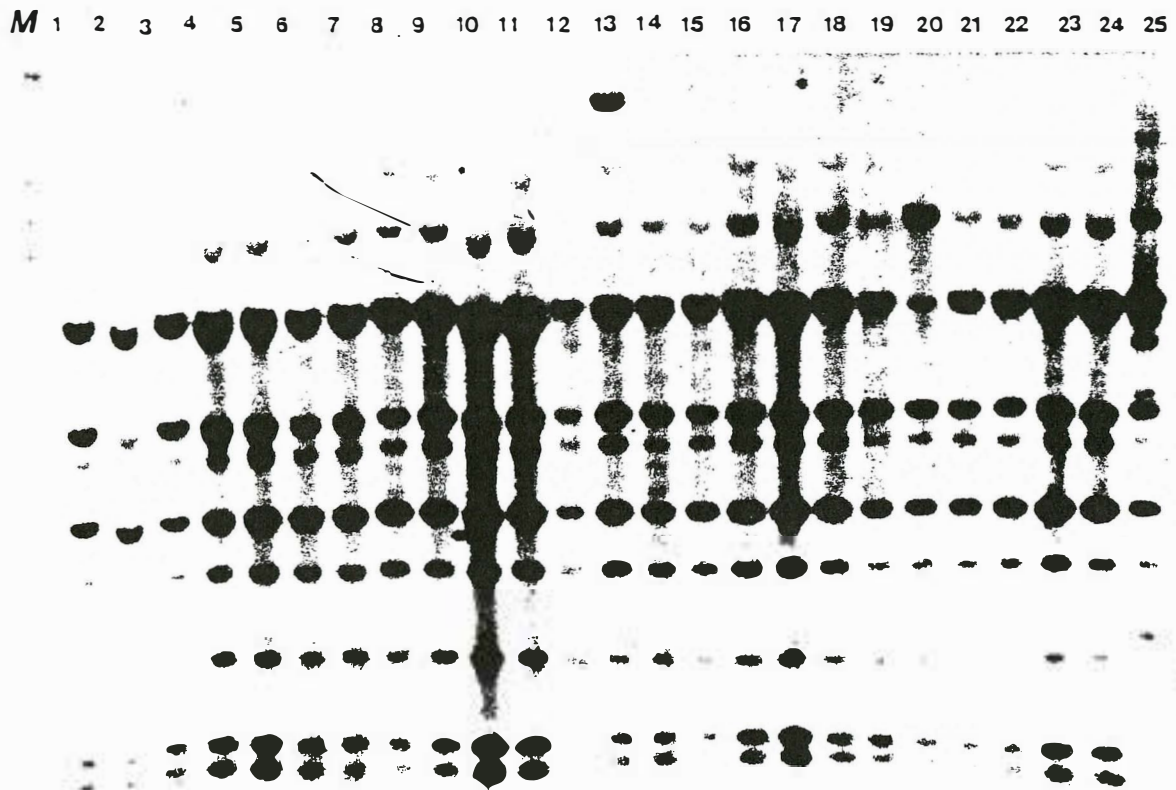


Figure 3-4

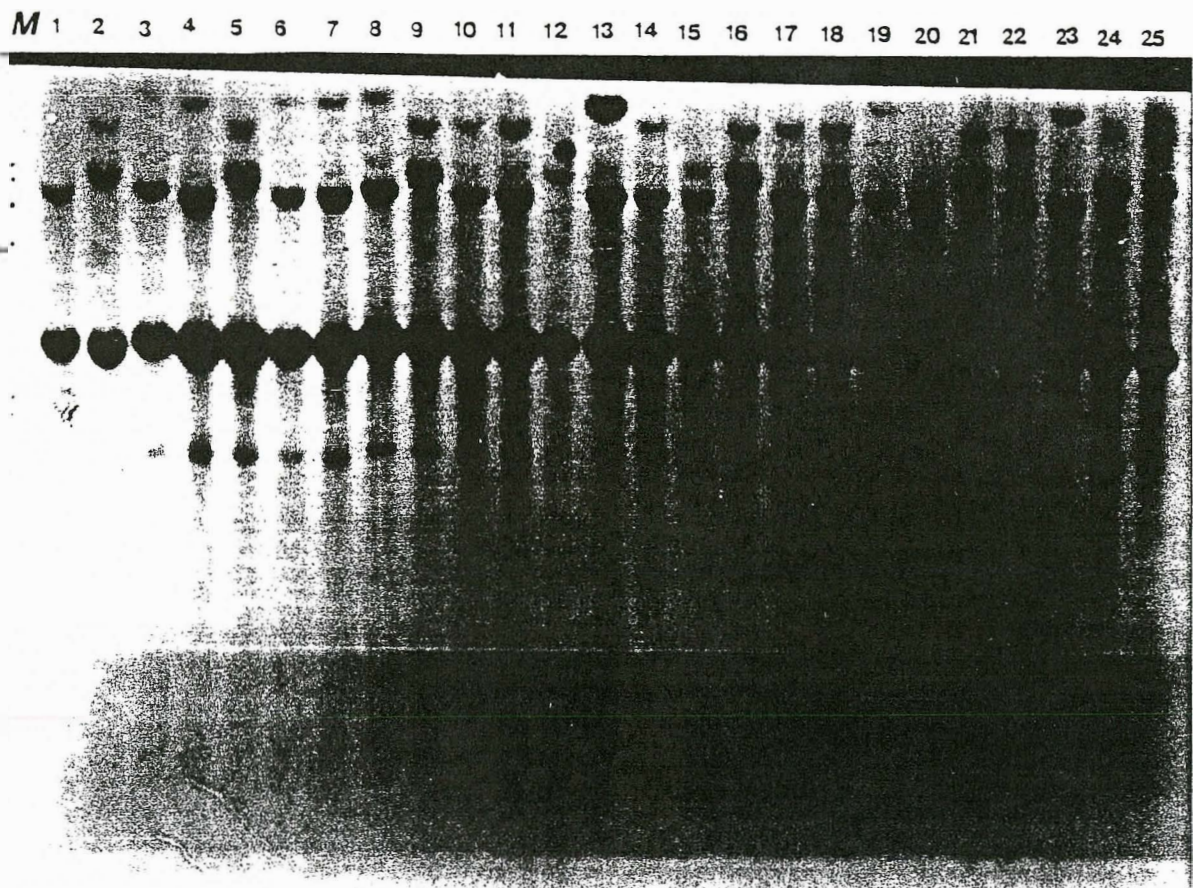


Figure 3-5

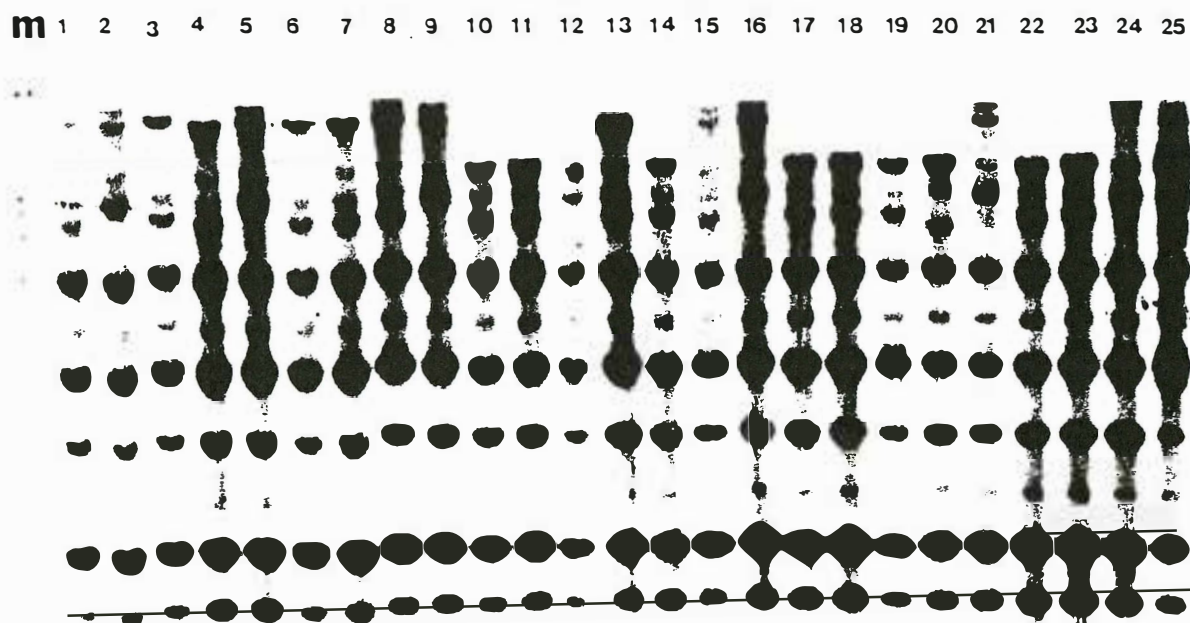


Figure 3-6

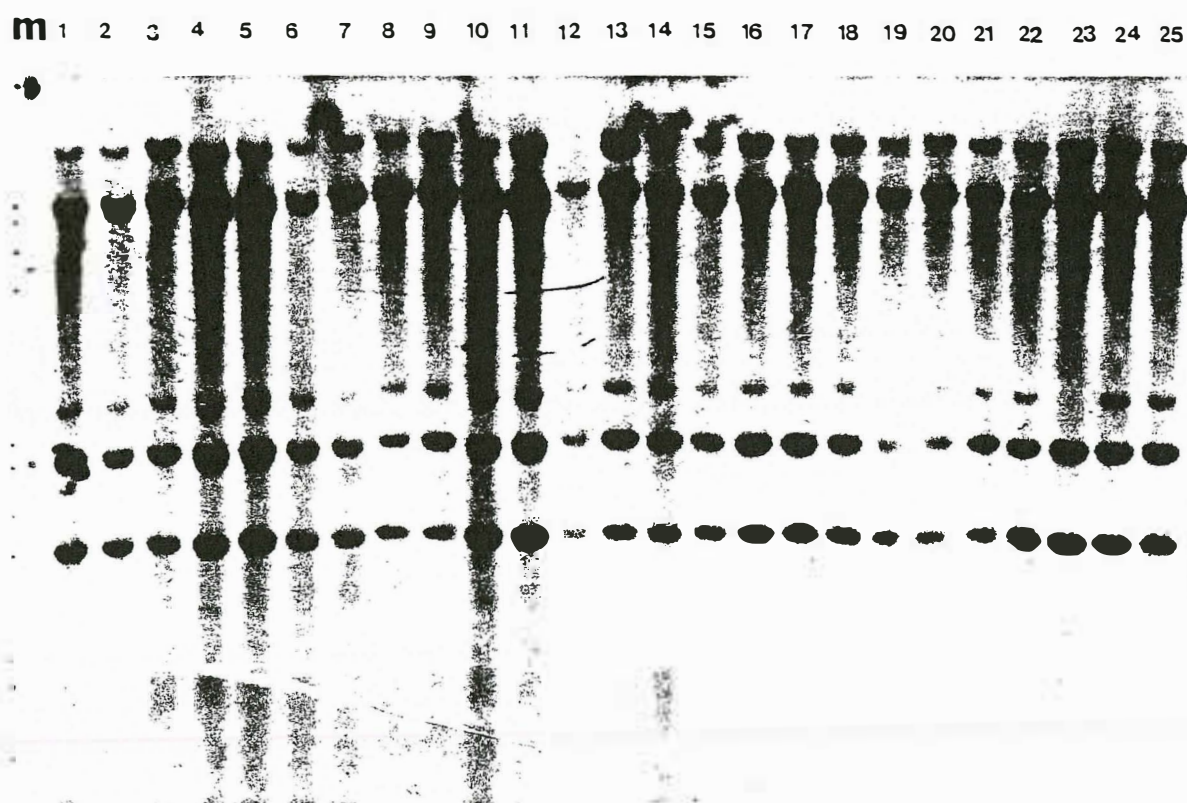


Figure 3-7

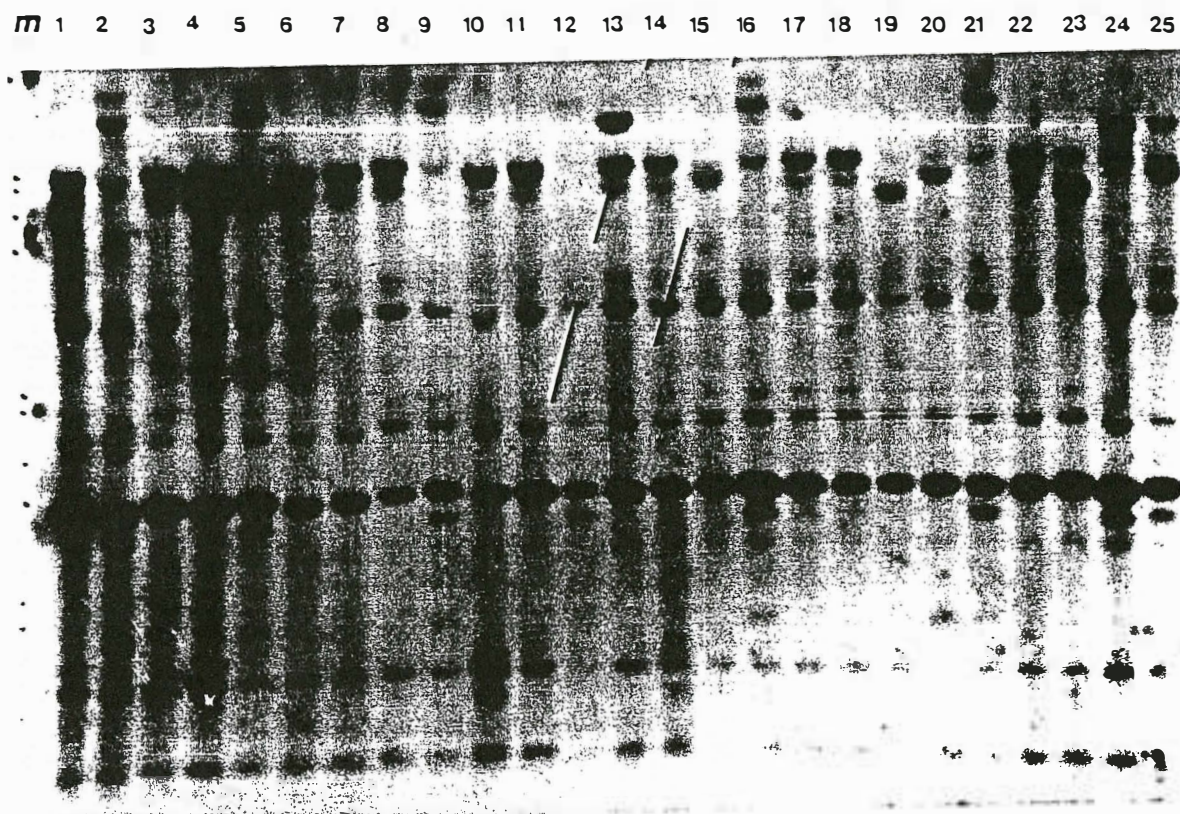


Figure 3-8

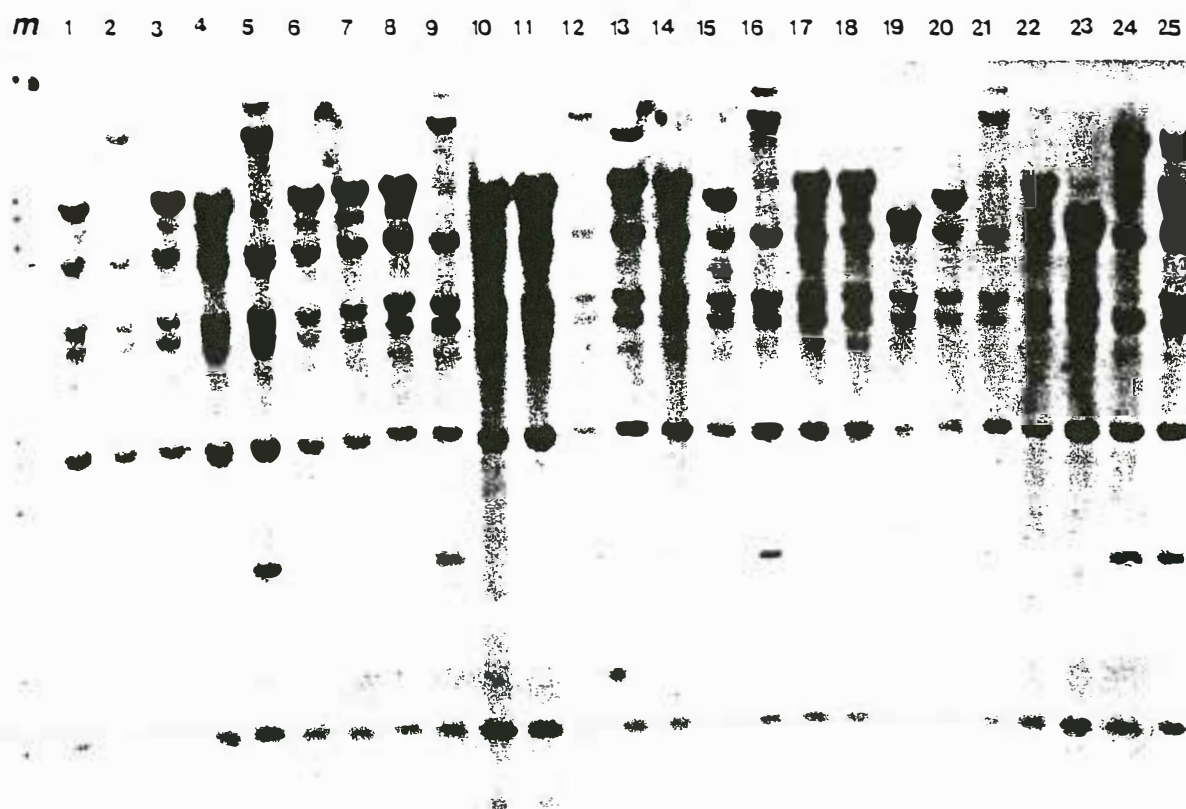


Tableau 18 - Génotypes mitochondriaux différents des clones analysés chez l'hévéa selon leur profil RFLP d'ADN mitochondrial

<u>Génotype Clone</u>	<u>Génotype Clone</u>	<u>Génotype Clone</u>	<u>Génotype Clone</u>	<u>Clone</u>
1. AC.S.08.12	AC.S.12.11	26. AC.T.02.04	43. RO.A.07.17	MT.C.06.25
	AC.S.12.12			MT.C.09.08
2. AC.S.08.84	AC.S.12.22	27. AC.T.02.10	44. RO.JP.03.26	MT.IT.13.12
	AC.S.12.45			MT.IT.13.18
3. AC.S.08.89	AC.S.13.16	28. AC.T.04.17	45. RO.JP.03.32	MT.IT.14.02
	AC.B.15.02			MT.IT.14.25
4. AC.S.08.93	AC.B.15.07	29. AC.G.05.19	46. RO.JP.03.22	MT.IT.15.30
	AC.B.15.11	AC.T.01.15	RO.OP.04.01	MT.IT.17.22
5. AC.S.11.02	AC.B.17.05	AC.T.02.02		
	AC.B.17.06	AC.T.02.08	47. RO.J.05.21	
6. AC.S.11.05	AC.B.17.09	AC.T.03.01		
	AC.B.18.05	AC.T.03.12	48. RO.J.06.08	
7. AC.S.11.27	AC.B.18.10			
	AC.B.18.11	30. AC.T.04.06	49. RO.CM.10.89	
8. AC.S.12.08	AC.B.19.04	AC.T.04.19		
	AC.B.19.06	AC.T.04.23	50. RO.J.05.04	
9. AC.S.13.02	AC.B.19.07	AC.T.04.24	RO.J.05.19	
	AC.B.19.08	AC.T.04.26	RO.J.06.11	
10. AC.S.13.04	AC.B.19.11		MT.C.01.10	
	AC.B.19.66	31. AC.F.GA.18	MT.C.11.04	
11. AC.S.13.07	AC.X.20.07		MT.C.11.05	
	AC.X.20.08	32. AC.F.06A.08	MT.C.15.30	
12. AC.B.15.11	AC.X.20.09			
	AC.X.20.10	33. AC.F.07.07	51. RO.J.05.08	
13. AC.B.17.08	AC.X.20.14		MT.C.02.45	
	AC.X.20.15	34. AC.F.07.18		
14. AC.B.18.07	AC.X.20.24		52. RO.CM.10.35	
	AC.X.20.27	35. AC.F.07.24	RO.CM.10.43	
15. AC.B.19.03	AC.X.20.31		RO.CM.11.87	
	AC.X.20.32	36. AC.F.07.34	RO.CM.12.19	
16. AC.B.19.05	AC.X.20.33		MT.VB.25A.04	
	AC.X.21.02	37. AC.F.5.13		
17. AC.X.21.02	AC.X.21.03	AC.F.5.14	53. MT.A.19.02	
	AC.X.21.04	AC.F.5.15	MT.A.19.03	
18. AC.X.21.10	AC.X.21.08	AC.F.5.16	MT.A.23.01	
	AC.X.21.10	AC.F.5.17		
19. AC.S.11.17	AC.X.21.12	AC.F.5.25	54. MT.VB.25A.07	
AC.X.20.14	AC.X.21.15	AC.F.6A.04		
	AC.X.21.18	AC.F.6A.10	55. MT.VB.25A.11	
20. AC.B.19.79		AC.F.6A.12		
AC.X.20.05	22. AC.S.08.78	AC.F.6A.22	56. MT.C.02.10	
	AC.S.08.93	AC.F.6A.28		
21. AC.S.09.11	AC.S.09.02	AC.F.07.27	57. MT.C.04.13	
AC.S.10.05	AC.S.10.06			
AC.S.10.08	AC.S.10.10	38. RO.C.08.09	58. MT.C.04.30	
AC.S.10.14	AC.S.10.11			
AC.S.10.16		39. RO.C.08.46	59. MT.C.05.11	
AC.S.11.25	23. AC.T.01.05			
AC.S.11.57		40. RO.C.09.04	60. MT.C.05.10	
AC.S.12.02	24. AC.T.01.16		MT.C.10.07	
AC.S.12.03		41. RO.C.09.20		
AC.S.12.04	25. AC.T.01.22		61. MT.C.02.17	
AC.S.12.05		42. RO.C.09.34	MT.C.06.02	

REFERENCES

- Heery D.M., Gannon F. and Powell R. (1990), A simple method for subcloning fragments from gel slices, Technical Tips **6**(6):173.
- Nei M., Li W.H. (1979), Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:5269-5273.
- Rogers S.C., Bendich A.Y. (1988), Extraction of DNA from plant tissues, in : Plant Molecular Biology Manual (S.B. Gelvin and R.A. Schilperoort, Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Ab:1-10.
- Scheepers D., Luo H. and Boutry M. (1990), A variant RNA is associated with cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*, Archives Internat. Physiol. Biochim. **98**(2), B93.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989), Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Van Coppenolle B. (1990) Etude de la variabilité génétique de l'hévéa à partir du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADN mitochondrial. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade d'Ingénieur Chimiste et des Industries Agricoles, Université Catholique de Louvain.

PUBLICATIONS 1990

- (1) Hevea Germplasm Africa Center : status of the collection. Rapport IRCA présenté au Symposium IRRDB Hevea breeding, Kunming Chine, Octobre 1990.
- (2) H. Legnate, A. Clément-Demange : Parent assessment and choice for genetic improvement of Hevea in Côte d'Ivoire, Symposium IRRDB Hevea breeding, Kunming Chine, Octobre 1990.
- (3) A. Clément-Demange et al. : Strategy for breeding the Hevea brasiliensis germplasm in IRCA, Côte d'Ivoire. Symposium IRRDB Hevea breeding, Kunming Chine, Octobre 1990.
- (4) H. Legnate : Comparaison de la valeur en combinaison de croisements inter et intra population chez Hevea brasiliensis, rapport interne IRCA 2ème sem. 1990.
- (6) P. Lebrun, M.H. Chevallier : Starch and Polyacrylamide gel electrophoresis of Hevea brasiliensis : a laboratory manual, Publication IRCA 1990
ISBN : 2 - 901317-13-8.